

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Autor: MUDr. Michal Dubský

**Název: Lokální a celkové patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu
diabetické nohy**

**Title: Local and systemic pathological processes in diabetic foot disease
and their management**

Typ závěrečné práce: **Dizertační**

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne

MUDr. Michal Dubský

Podpis

Identifikační záznam:

DUBSKÝ, Michal. *Lokální a celkové patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu diabetické nohy. [Local and systemic pathological processes in diabetic foot disease and their management]*. Praha, 2013. Počet stran 186, 23 příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika diabetologie IKEM. Školitel Jirkovská, Alexandra.

Souhrn

V patogenezi syndromu diabetické nohy (SDN) se uplatňují nejen lokální tkáňové faktory a ischemie, ale i infekce, která může být současně příčinou reulcerací. Neuropatická porucha kostního metabolismu vede k Charcotově osteoartróze (CHOA).

Cílem dizertační práce bylo posoudit efektivitu aplikace nových kožních krytů v experimentu, dále zhodnotit lokální vaskulogenezi při různých metodách buněčné léčby SDN, vymezit roli infekce u reulcerací a definovat scintigrafické parametry aktivity CHOA.

Ve studiích zabývajících se **problematikou lokálních patologických procesů u SDN** jsme prokázali v experimentu, že želatinová nanovlákná akcelerují hojení rány a mohou být vhodným buněčným nosičem pro kožní regeneraci a že acellulární porcinní dermis je účinnější v procesu hojení ran v porovnání s xenotransplantáty.

Ve studiích zabývajících se **problematikou terapeutické vaskulogeneze** jsme zjistili, že účinnost kmenových buněk (KB) z kostní dřeně je obdobná jako účinnost KB z periferní krve po stimulaci. Při posuzování rizika systémové vaskulogeneze jsme nezjistili signifikantní vzestup sérových hladin pro-angiogenních cytokinů, což svědčí pro parakrinní efekt KB. Prokázali jsme signifikantní korelaci inhibitoru angiogeneze (endostatinu) s množstvím aplikovaných KB, což by mohlo odrážet lokální vaskulogenezi. Při výzkumu vhodných zobrazovacích metod pro lokální vaskulogenezi jsme neprokázali jednoznačný přínos perfuzní scintigrafie lýtkových svalů. Efekt terapeutické vaskulogeneze byl dle výsledků naší další studie srovnatelný se standardní léčbou pomocí perkutánní transluminální angioplastiky.

V další studii jsme prokázali významný **vliv infekce**, především osteomyelitidy, na rekurenci SDN. V poslední studii jsme definovali nové kvantitativní scintigrafické parametry vhodné pro **posouzení aktivity CHOA**.

Klíčová slova: syndrom diabetické nohy, nanovlákná, acellulární porcinní dermis, revaskularizace, buněčná terapie, terapeutická vaskulogeneze, angiogenní cytokiny, reulcerace, Charcotova osteoartróze

Summary

Local tissue factors, ischemia and infection (which are often the cause of re-ulceration) are the main pathogenetic factors for diabetic foot disease (DFD). Neuropathic bone metabolism disorder leads to Charcot osteoarthropathy (CHOA).

The aim of this dissertation was to assess experimentally the effectiveness of new skin substitutes, evaluate local vasculogenesis in different types of cell therapy of DFD, the role of infection in recurrence of DFD and scintigraphic parameters of activity of CHOA.

Our studies concerning **local pathological processes in DFD** experimentally proved that gelatine nanofibers accelerate wound healing and can be suitable scaffolds for cell transfer and skin regeneration and also that acellular porcine dermis is more effective in healing of chronic wounds than xenotransplants.

Our studies concerning **therapeutic vasculogenesis** confirmed that efficacy of stem cells (SC) harvested from bone marrow is similar in efficacy to SC separated from peripheral blood after stimulation. We found no evidence for systemic vasculogenesis by means of a significant increase of pro-angiogenic cytokines, which confirms the paracrine effect of injected SC. We proved a significant correlation between angiogenesis inhibitor (endostatin) and the number of injected SC, which could be an indicator of local vasculogenesis. During the research of imaging techniques for local vasculogenesis, we did not ascertain the benefit of perfusion scintigraphy of the calf muscles. The effect of therapeutic vasculogenesis was in accordance with our results comparable with the effect of percutaneous transluminal angioplasty.

Our next study showed a significant **influence of infection** (osteomyelitis in the first place) in the recurrence of DFD. In the last study, we defined new quantitative scintigraphic parameters suitable for **assessment of CHOA activity**.

Key words: diabetic foot disease, nanofibers, acellular porcine dermis, revascularization, cell therapy, therapeutic vasculogenesis, angiogenic cytokines, reulceration, Charcot osteoarthropathy

Obsah

Souhrn dizertační práce.....	3
Summary of dissertation thesis.....	4
1 Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice.....	7
1.1 Lokální patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu diabetické nohy.....	7
1.1.1 Patofyziologie hojení ran u syndromu diabetické nohy.....	7
1.1.2 Aktivace hojení	7
1.2 Celkové patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu diabetické nohy	9
1.2.1 Terapeutická vaskulogeneze u ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) a syndromu diabetické nohy	9
1.2.2 Infekce u syndromu diabetické nohy	12
1.2.3 Kostní metabolismus u Charcotovy osteoarthropatie	13
2 Cíle dizertační práce	15
3 Vybrané metodiky jednotlivých studií.....	16
3.1 Výroba nanovláken (studie 1).....	16
3.1.1 Příprava nanovláken a kultivace buněk.....	16
3.2 Izolační metody a aplikace kmenových buněk (studie 3-6)	18
3.2.1 Izolace kmenových buněk z kostní dřevě.....	18
3.2.2 Izolace kmenových buněk z periferní krve	19
3.2.3 Aplikace buněčné suspenze	19
3.3 Stanovení CD34+ buněk a sérových hladin angiogenních cytokinů (studie 4)	20
3.4 Dynamická scintigrafie lýtkových svalů k posouzení účinnosti buněčné terapie syndromu diabetické nohy (studie 5)	21
4 Přehled studií.....	22
4.1 Patologické procesy v oblasti hojení ran	22
4.1.1 Studie 1: Posouzení nanovláken vyráběných bezjehlovou technologií elektrospinningu v hojení ran izolovaně i jako potenciální nosiče kompetentních buněk pro přípravu lokálních krytí (Přílohy 1-3).....	22

4.1.2 Studie 2: Acellulární porcinní dermis v léčbě syndromu diabetické nohy a její porovnání s xenogenními transplantáty (Přílohy 4-6).....	25
4.2 Terapeutická vaskulogeneze u ischemické choroby dolních končetin a syndromu diabetické nohy.....	27
4.2.1 Studie 3: Porovnání efektu dvou různých metod izolace autologních kmenových buněk (z kostní dřeně nebo z periferní krve po stimulaci kostní dřeně) u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a syndromem diabetické nohy (Přílohy 7-9)	27
4.2.2 Studie 4: Posouzení lokální a systémové vaskulogeneze po aplikaci kmenových buněk u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a diabetem (Přílohy 10-13)	31
4.2.3 Studie 5: Zobrazení vaskulogeneze po aplikaci kmenových buněk u syndromu diabetické nohy pomocí perfuzní scintigrafie (Příloha 14)	34
4.2.4 Studie 6: Porovnání efektu aplikace kmenových buněk se standardní revaskularizací pomocí perkutánní transluminální angioplastiky u pacientů se syndromem diabetické nohy (Přílohy 15-19). 35	
4.3 Infekce u syndromu diabetické nohy	38
4.3.1 Studie 7: Posouzení rizikových faktorů recidivy syndromu diabetické nohy s přihlédnutím k osteomyelitidě (Přílohy 20-22).....	38
4.4 Kostní metabolismus u Charcotovy osteoarthropatie	40
4.4.1 Studie 8: Role kvantitativních parametrů dynamické scintigrafie v hodnocení kostního obratu u pacientů s Charcotovou nohou (Příloha 23).....	40
5 Závěry a shrnutí dizertační práce	42
6 Poděkování	44
7 Seznam použitých zkratk	45
8 Seznam použité literatury	46
9 Přehled vlastních publikací	50
9.1 Publikace týkající se tématu dizertační práce	50
9.2 Publikace, které přímo nesouvisí s tématem dizertační práce.....	55
10 Přílohy dizertační práce	64

1 Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice

Syndrom diabetické nohy (SDN) je definován podle Mezinárodního konsensu jako defekt nebo postižení hlubokých tkání nohy distálně od kotníku včetně kotníku se současně přítomnou ischemií a neuropatií dolní končetiny [1]. Jedná se ulcerace, gangrény, ale i závažné postižení kostí osteomyelitidou nebo Charcotovou osteoarthropatií (CHOA) [2]. Současná přítomnost ischemie, infekce a diabetické neuropatie vede k velmi komplikovanému hojení a často končí vyšší amputací [3].

1.1 *Lokální patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu diabetické nohy*

1.1.1 Patofyziologie hojení ran u syndromu diabetické nohy

U pacientů se SDN přecházejí ulcerace často do chronického stadia, protože je narušen normální proces hojení ran. Chronická rána je charakterizována přítomností ischemie nebo rekurentního traumatu při nedostatečném odlehčení rány, prolongovaným zánětem a infekcí, lokálním poklesem růstových faktorů a vzestupem tkáňových proteáz [4]. Hojení je narušeno extrinsickými (rekurentní trauma, ischemie, infekce) i intrinsickými (porucha funkce leukocytů, snížená aktivita fibroblastů, abnormální produkce extracelulární matrix) faktory [5]. Hojení ran je komplex biologických pochodů zahrnujících chemotaxi, buněčnou reprodukci a obnovu mezibuněčné tkáně, proces neovaskularizace a remodelaci jizvy. Základní 3 fáze hojení ran – časné zánětlivé stadium, granulační stadium s fibroplázií a angiogenezí a stadium maturace s reepitalizací a remodelací jsou kontrolovány růstovými faktory [6].

Hojení chronické rány lze aktivovat vytvořením optimálního prostředí v ráně a jejím okolí, zlepšením oxygenace, zmenšením edému, ovlivněním infekce, odlehčením rány a jejím čištění pomocí debridementu. Roli hraje buněčná aktivita s produkcí cytokinů – časná zánětlivá reakce, která je oslabená.

Chronické defekty při SDN se dělí na neuropatické, neuro-ischemické a čistě ischemické léze [1]. Chronické rány u pacientů s diabetem vznikají často na podkladě kombinace více rizikových faktorů, z nichž jednou z nejdůležitějších je diabetické neuropatie. Periferní neuropatie může zpomalit časnou zánětlivou reakci, u aktivní CHOA jí však může naopak urychlit [7]. U diabetické periferní neuropatie jsou postižena všechna vlákna (senzorická, motorická i autonomní).

1.1.2 Aktivace hojení

Nanovlákná jsou novým materiálem, který by mohl vést k aktivaci hojení jako nosič pro keratinocyty nebo kmenové buňky při lokální buněčné léčbě. Membranózní charakter nanovláken byl využit jako lokální krytí v hojení ran [8, 9]. Vysoká porozita s malou velikostí pórů umožňuje dobrou permeabilitu pro kyslík a vodu a také absorpci tekutin, chrání ránu před průnikem bakterií a dehydratací. [8, 10]. Tyto vlastnosti umožňují migraci keratinocytů do lůžka rány a mohou hrát důležitou roli při urychlení hojení chronické rány. Žádné nežádoucí účinky lokální aplikace nanovláken nebyly popsány.

V léčbě povrchových chronických defektů dolních končetin u diabetiků se osvědčilo použití různých druhů kožních štěpů. **Autologní kůže pacienta** (přenesený kožní štěp) není vždy optimálním typem kožního krytí, protože diabetické ulcerace jsou často lokalizovány plantárně, kde jsou přenesené štěpy např. z oblasti stehna vystaveny nefyziologickému

tlakovému zatížení. Autologní kožní štěp z nezatěžované oblasti není na plantární tlak adaptován a dochází k morfologickým změnám, hyperkeratózám, tvorbě keratomů a ke zvýšení rizika malignizace.

Jinou možností terapie chronických ulcerací je **allogenní kožní štěp** z kadaverózních dárců. Není nutné vyšetřovat krevní skupinu ani HLA kompatibilitu, používají se allogenní štěpy uložené ve zmraženém stavu ve tkáňové bance. Kadaverózní allotransplantáty vykazují pozitivní efekt na hojení diabetických ulcerací, jejich dostupnost je však omezená (nutnost mražení, transport ze vzdálené tkáňové banky) a lze je obtížně skladovat.

Xenotransplantáty se používaly již mnoho let k léčbě chronických nehojících se defektů [11]. Zdrojem xenotransplantátů (dočasné náhrady kůže) jsou čerstvé, nespážené, veterinárně kontrolované jateční krupony. Z nich jsou po přípravě odebrány za sterilních podmínek jemné dermo-epidermální štěpy o síle 0,2-0,3 mm a o rozměrech zhruba 30 x 7 cm. Tyto štěpy nemohou být vzhledem k mikrobiálnímu osídlení kůže běžného jatečního zvířete použity přímo ke krytí kožních defektů, nejprve musí projít laváží chemoterapeutik a antibiotik. Poté je sterilita štěpů testována v mikrobiologické laboratoři a teprve na základě negativního výsledku mohou být použity k léčbě pacientů. Účinnost allogenních i xenogenních kožních krytů je podobná, stejně tak nevýhody obtížné skladovatelnosti a komplikované dopravy.

Velmi efektivní v léčbě SDN jsou **umělé kožní deriváty**. Jedná se o biomateriály s navázanými růstovými faktory, živými buňkami nebo genovými produkty [12-15]. Dvojvrstevné kožní náhrady (bi-layered bioengineered skin substitutes - BBSS) se skládají z epidermální vrstvy tvořené lidskými keratinocyty a z dermální vrstvy tvořené lidskými fibroblasty a z matrix, kterou bývá např. bovinní kolagen typu I. Podle jedné z posledních metaanalýz z roku 2010, která hodnotila 7 randomizovaných kontrolovaných studií provedených na 880 pacientech, byla léčba BBSS ve srovnání s kontrolní léčbou (sterilní gáza s fyziologickým roztokem) účinnější v terapii chronických nehojících se defektů, nebyly pozorovány žádné závažné nežádoucí účinky této terapie a ve srovnání s kontrolní skupinou byl nižší výskyt infekcí v ráně [16]. Za hlavní nevýhody těchto moderních kožních derivátů je považována vysoká cena a omezená dostupnost. Jednou z vhodných alternativ této léčebné metody je použití **acellulární porcinní dermis** (APD).

APD je získána enzymatickou degradací epidermis a dermálních buněk, poté je vysušena a sterilizována jak zářením, tak chemicky. Původně byla APD vyvinuta jako podklad pro kultivaci lidských keratinocytů. Bezbuněčná dermis je připravována z pruhů prasečí kůže o síle 0,3 – 0,5 mm odebíraných z jatečních zvířat v kožní bance. Je dodávána a skladována v sušeném stavu. APD je indikována jako dočasné krytí povrchových a hlubokých dermálních popálenin, nekrektomovaných ploch a odběrových ploch po odběru kožních štěpů [17]. Ve spojení s allogenními kultivovanými keratinocyty se jedná o velmi účinnou léčbu popálenin [18] a je jí možné použít i k hojení diabetických ulcerací. Hlavní výhodou APD oproti allogenním a xenogenním krytím je její výborná skladovatelnost v sušeném stavu, dobrá dostupnost a přijatelná cena.

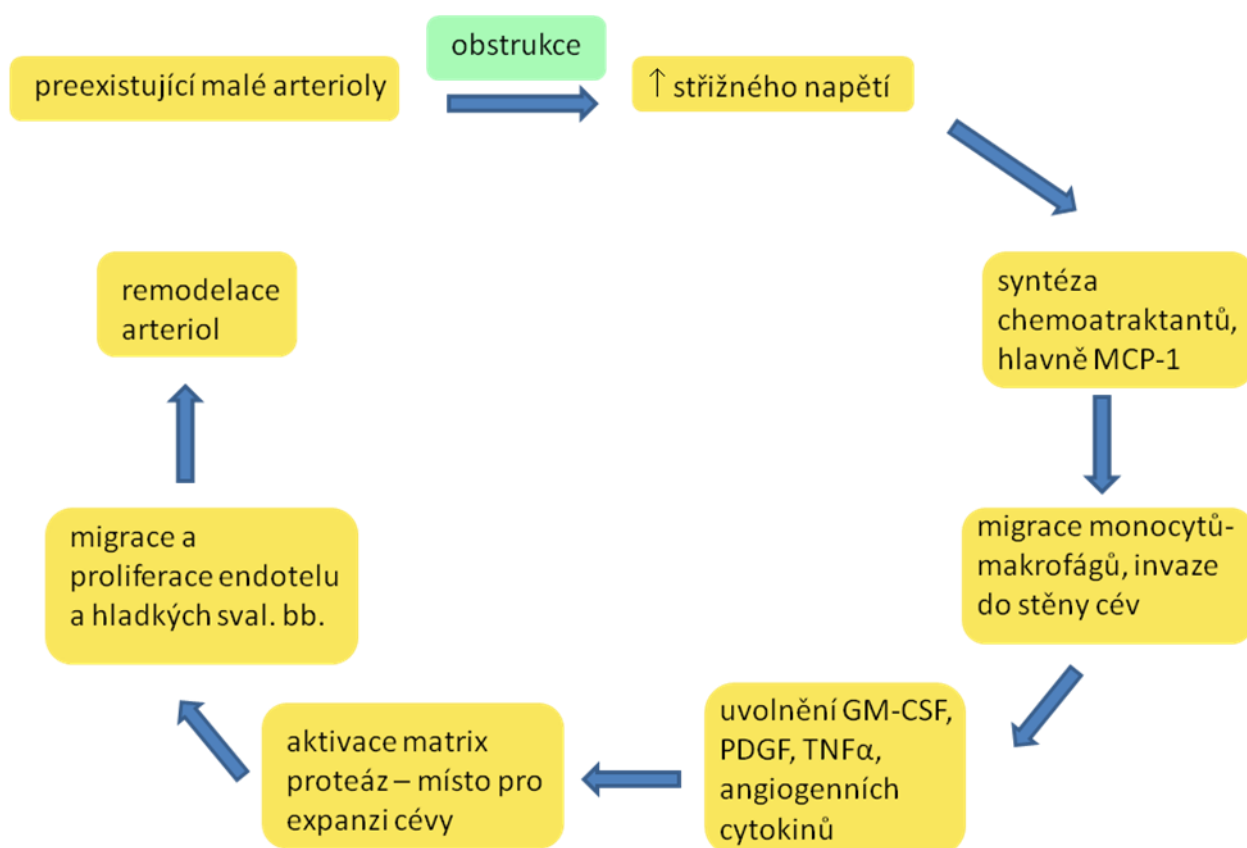
1.2 Celkové patologické procesy a jejich ovlivnění u syndromu diabetické nohy

1.2.1 Terapeutická vaskulogeneze u ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) a syndromu diabetické nohy

1.2.1.1 Patofyziologické mechanismy vaskulogeneze při buněčné terapii ICHDK u diabetiků

Při **vaskulogenezi** (novotvorbě cév) hrají roli tři základní mechanismy [19-21]:

- **Angiogeneze**, fyziologický proces vycházející z původních kapilár, který je výrazně indukován hypoxií a vede k tvorbě nových kapilár z preexistujících cév. Nejdůležitějším cytokinem ovlivňujícím angiogenezi je hypoxia inducibilní faktor 1 α (HIF1- α), který vede k diferenciaci, proliferaci a migraci endotelových prekursorových buněk (EPC), zvyšuje expresi endotelových povrchových markerů (CD31 a receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor – VEGF-R2) a vede ke zvýšenému uvolňování vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a oxidu dusnatého (NO) [22]. Podstatou angiogeneze je proliferace a migrace buněk do stěn cév spolu s inhibicí apoptózy [20]. Výsledkem angiogeneze jsou pouze malé kapiláry (průměru 10-20 μ m), které nejsou schopny adekvátně kompenzovat tkáňovou ischemii.
- **Arteriogeneze** (Obrázek 1) je proces remodelace preexistujících arterioarteriolárních anastomóz na plně vyvinuté arterie stimulovaný střížným napětím vzniklým zvýšeným hydrostatickým tlakem tekutin při obstrukci cévy, což vede k aktivaci syntézy chemoatraktantů a k migraci monocytů, které se přeměňují na makrofágy, uvolňují cytokiny a aktivují matrix proteázy v perivaskulárním prostoru. Tyto proteázy rozrušují okolí rostoucí cévy čímž vytvářejí prostor pro expanzi a proliferaci kolaterální arterioly [23]. Preexistující arterioly, které jsou iniciálně velmi slabě perfundované, mohou zvětšit svůj průměr až dvacetkrát. Proces arteriogeneze je schopen plně kompenzovat tkáňovou ischemii a předpokládá se, že je hlavním mechanismem účinku při terapii autologním kmenovými buňkami (KB).
- **De-novo formace cév** je spíše hypotetickou možností, jedná se o tvorbu vnitřních endoteliálních vrstev s následnou maturací arterioly vrstvou svalových buněk [21].



Obr 1. Schéma arteriogeneze

1.2.1.2 Zdroje kmenových buněk a klinické studie terapeutické vaskulogeneze

K terapeutické vaskulogenezi ICHDK pomocí KB lze využít dva základní zdroje, které obsahují subpopulaci cévních progenitorových buněk - mononukleární frakci stromálních buněk kostní dřeně získanou trepanobiopsií - **bone marrow mononuclear cells** (BMMNC) a frakci progenitorových buněk získanou separací z periferní krve po předchozí aplikaci faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF - filgrastim) - **peripheral blood progenitor cells** (PBPC). Oba typy kmenových buněk byly opakovaně využity k revaskularizaci ischemických končetin v klinických studiích [24, 25]. Mezi povrchové znaky buněk, které se podílejí na novorvorbě cév, patří např. povrchový glykoprotein CD34 [26], VEGF-R2 [27] a povrchový znak CD133. Další povrchové znaky jsou stále předmětem výzkumu [19].

Jedním z nejdůležitějších zdrojů kmenových buněk u dospělých jedinců je kostní dřeň. Existuje několik derivátů dřeňových buněk, které se účastní procesu hojení tkání [28]. Jednou z buněčných populací zodpovědnou za terapeutickou vaskulogenezi jsou EPC, které mají vlastnosti angioblastů a exprimují povrchové antigeny CD 133, CD 34 a VEGF-R2. Po migraci z kostní dřeně do cirkulace začnou EPC exprimovat markery endotelu jako VE-cadherin, NO-syntázu a von Willebrandův faktor [29]. EPC se podílejí na opravách endotelu a neovaskularizaci u ischemií postižených orgánů, ovšem přesný mechanismus účinku není dodnes znám.

Bylo prokázáno, že monocyty-makrofágy i KB mají schopnost angiogeneze i arteriogeneze. Není však zatím jasné jakou roli hraje diferenciace a exprese jednotlivých růstových faktorů produkovaných autologními KB při jejich intramuskulární aplikaci, ani

kteřé typy dřeňových nebo periferních KB jsou v procesu revaskularizace nejefektivnější [23]. Důkazy pro funkci specifické buněčné linie v procesu revaskularizace existují v experimentu pro CD34+ buňky izolované z periferní krve. Jejich lokální podání u diabetických myši vedlo k urychlení revaskularizace, resp. zvýšení počtu i průměru cév v ráně [30]. Účinek podaných buněk lze přisoudit jak jejich diferenciaci v buňky cév [31], tak i parakrinní sekreci angiogenních faktorů [32]. Stále není dořešeno, jaký zdroj kmenových buněk je optimální a jakým mechanismem přesně KB působí – zda parakrinním nebo celkovým přes vyplavené angiogenní růstové faktory.

Jedna z prvních randomizovaných studií hodnotila efekt terapie BMMNC na ICHDK [25]. Po 24 týdnech došlo k signifikantně vyššímu vzestupu indexu kotník paže (ankle-brachial index - ABI) a transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂) u končetin léčených BMMNC oproti končetinám léčeným periferními mononukleárními buňkami. Angiografie byla zaslepeně hodnocena dvěma radiology a jedním cévním chirurgem. Ke zlepšení angiografického nálezu došlo u 60 % ze 45 pacientů. Ke zmířění klidové bolesti došlo u 80 % z 20 pacientů.

Huang ve své studii hodnotil účinek intramuskulární aplikace PBPC separovaných z periferní krve po stimulaci G-CSF [24] u 28 pacientů s diabetem a kritickou končetinovou ischemií. Po 3 měsících došlo k signifikantnímu zvýšení průtoku měřeným laser dopplerem a k signifikantnímu zvýšení ABI u pacientů léčených PBPC. 78 % pacientů s ulcerací bylo zhojeno ve srovnání s 39 % u kontrolní skupiny.

V ostatních studiích [33, 34] bylo prokázáno, že lokální podání PBPC nebo BMMNC vede ke zlepšení ischemie u pacientů s ICHDK, může významně zlepšit klinický stav těchto pacientů a nebyly zjištěny závažné nežádoucí účinky. Dle studie publikované Klepance nebyl prokázán významný rozdíl mezi intraarteriální a intramuskulární aplikací KB [35].

V roce 2010 bylo publikováno několik metaanalýz shrnujících klinické studie zabývající se léčbou ICHDK kmenovými buňkami [23, 36]. Bylo pozorováno zlepšení parametrů ischemie po 6 měsících od terapie kmenovými buňkami, a to jak ABI, tak i TcPO₂, snížení bolesti i zlepšení hojení ulcerací a snížení amputací. Autoři dosud publikovaných prací se ale shodují v tom, že je nutné sledovat dlouhodoběji [20].

1.2.1.3 Role angiogenních cytokinů při terapeutické vaskulogenezi a možnosti zobrazovacích metod

VEGF, bazický fibroblastový růstový faktor (b-FGF), angiopoietin-1 (Ang-1), destičkové růstové faktory (PDGF-AA a PDGF-BB) a endogenní inhibitor angiogeneze (endostatin) jsou hlavními cytokiny modulujícími vaskulogenezi po léčbě KB. Zvýšené hladiny VEGF a b-FGF byly asociovány s růstem kolaterální cév [37]. VEGF a ostatní pro-angiogenní faktory se vážou na receptory s vnitřní tyrosin-kinázovou aktivitou, což vede k intracelulární aktivaci protein-kinázové kaskády a následné migraci a proliferaci endotelu [38]. Endostatin, c-terminální štěpný produkt kolagenu typu XVIII, inhibuje VEGF- a b-FGF-indukovanou migraci endoteliálních buněk a redukuje intimální neovaskularizaci [39, 40].

Vaskulogenezi na úrovni mikrocirkulace je velmi obtížné vizualizovat. Hodnocení novotvořených kapilár pomocí kontrastní angiografie je velmi obtížné pro velkou variabilitu zobrazení množstvím kontrastu, rychlostí jeho podávání a sekvencí snímání [41]. Scintigrafie jako dynamická metoda je standardně využívána k hodnocení perfuze myokardu [42].

1.2.1.4 Terapeutická vaskulogeneze a standardní léčba ICHDK

Mezi standardní léčebné metody ICHDK patří perkutánní transluminální angioplastika (PTA) a cévní bypassy, jejichž efekt je v některých případech pouze dočasný a dochází k recidivám klinických příznaků.

Peregrin [43] hodnotil klinický efekt infrapopliteální PTA v rozsáhlém souboru 1268 pacientů. Primární roční záchrana končetiny byla u 76,1 %, sekundární pak u 84,4 % pacientů, přičemž většina zařazených pacientů měla kritickou končetinovou ischemii se dvěma a více neprůchodnými bérčovými tepnami stupně C a D dle Trans-Atlantic Intersociety Consensu [44]. Mezi hlavní faktory ovlivňující klinický výsledek PTA podkolenních tepen patřil počet průchodných tepen těsně po PTA. Pacienti s diabetem a chronickým renálním selháním léčeným dialýzou měli signifikantně nižší roční záchranu končetiny (66,5 %).

Efekt PTA a periferního cévního by-passu v terapii infrainguinální ischemie porovnávala multicentrická randomizovaná kontrolovaná studie BASIL (The Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg) prováděná ve 27 centrech ve Velké Británii [45]. Celkem 450 pacientů s těžkou ICHDK diagnostikovanou pomocí digitální subtrakční angiografie bylo randomizováno na 222 pacientů léčených PTA a 228 by-passem. V obou skupinách bylo 42 % diabetiků. Primárním sledovaným ukazatelem bylo zachování končetiny, dále přežití, zlepšení kvality života a porovnání ceny/efektivity. Incidence amputací ani přežití se signifikantně nelišily u obou metod po 3-letém sledování. Náklady na léčbu byly 1. rok signifikantně vyšší u by-passu, ale ve 3- a 7-letém sledování byly bez signifikantního rozdílu, stejně jako kvalita života hodnocená pomocí standardizovaného dotazníku.

Až u jedné třetiny pacientů ale není indikována standardní revaskularizace z důvodů opakovaných technických neúspěchů nebo nemožnosti jejího provedení a tito pacienti mohou profitovat z terapie autologními KB [36].

1.2.2 Infekce u syndromu diabetické nohy

Infekce se významně patogeneticky podílí na vzniku ulcerací i na jejich chronicitě, a to zejména při současné ischemii končetiny [46]. Ke špatnému průniku antibiotik do tkáně a k selekci rezistentních kmenů vedou především ICHDK a osteomyelitida. Infekce dále zhoršuje ischemizaci tkání septickou mikrotrombotizací a kompresí mikrocirkulace při zánětlivém edému; významný podíl na patofyziologickém působení infekce mají i lysozomální enzymy a přímý vliv endotoxinů na nekrotizaci tkání. Infekce hraje důležitou roli nejen v hojení ulcerací, ale může mít i vliv na jejich recidivu [47, 48].

1.2.2.1 Recidiva syndromu diabetické nohy, význam osteomyelitidy

Zatím bylo publikováno pouze několik studií hodnotících rizikové faktory podmiňující reulcerace a vztah k infekci u syndromu diabetické nohy [1, 49]. V prospektivní kohortě 81 pacientů pozoroval Peters reulceraci u 60,5 % pacientů během 31 měsíců od zhojení [50]. Apelqvist popsal recidivu syndromu diabetické nohy u 61 % ze 468 zhojených pacientů po nízké nebo vysoké amputaci během 3letého sledování [51]. Mezi nejvýznamnější faktory zvyšující riziko reulcerací v této studii patřily lokalizace na plantě, přítomnost ischemie a předchozí amputace.

Významným faktorem při vzniku ulcerací i jejich recidivě může být osteomyelitis. Její role při reulceracích může stoupat, protože terapie osteomyelitidy u SDN je obtížná pro špatný průnik antibiotik do kostí, nízké lokální koncentrace antibiotik u ICHDK, častý vznik rezistence na antibiotika u mikrobů kultivovaných z kostní tkáně apod [52]. Proto vzniká často chronická osteomyelitida, která pak může vést k šíření infekce do měkkých tkání.

Konzervativní léčba akutní osteomyelitidy byla klinicky úspěšná v 65-80 % případů, většina studií však nebyla randomizovaných [46, 53].

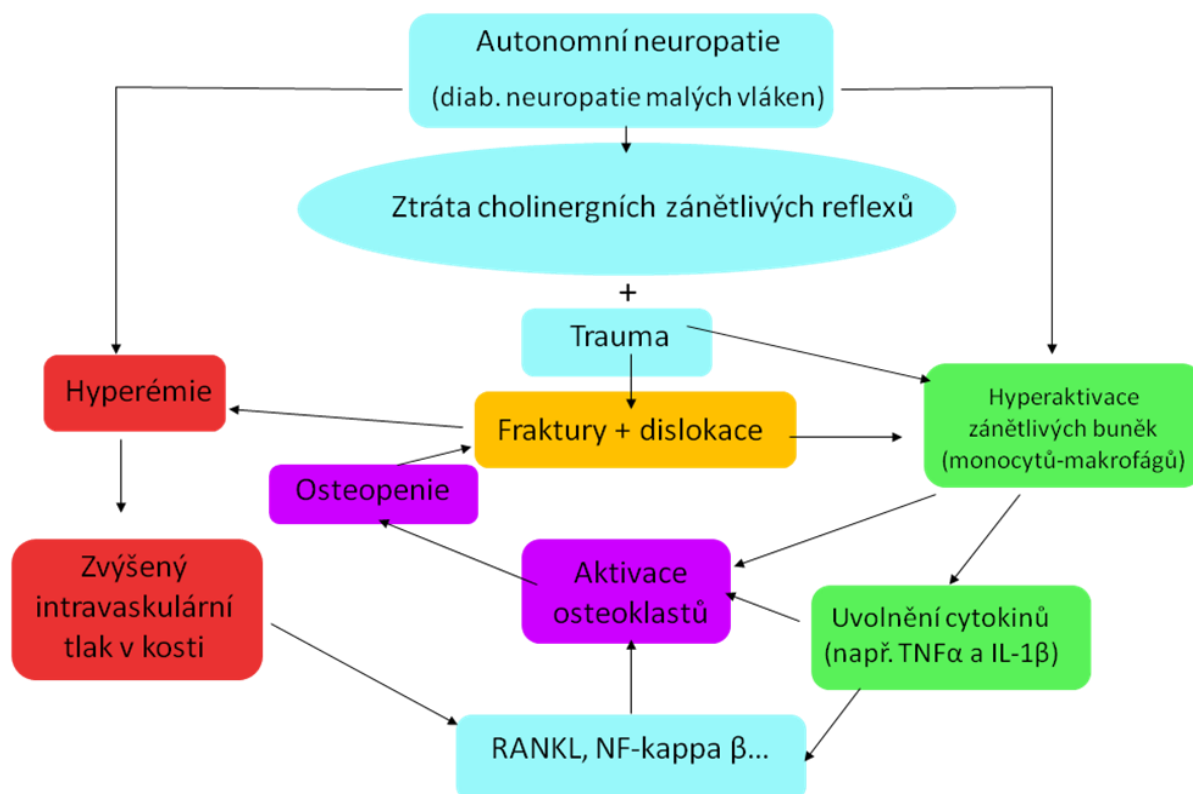
1.2.3 Kostní metabolismus u Charcotovy osteoarthropatie

1.2.3.1 Definice

CHOA je progresivní destruktivní onemocnění kostí a kloubů nohy, jehož hlavní příčinou je diabetická neuropatie. Může postihovat až 10 % pacientů s diabetickou neuropatií [54]. Ačkoliv je postižení CHOA asymetrické, v řadě případů může navazovat postižení druhé končetiny, a to až v 75 % [55]. Interakce několika faktorů při CHOA (diabetes, senzomotorická a autonomní neuropatie, trauma a metabolické změny v kosti) vedou k lokalizovanému zánětu, který způsobuje destrukci kostí, subluxace, dislokace a deformity [56].

1.2.3.2 Patogeneze

Jasná a jednotná příčina vzniku CHOA není dosud známa, ale předpokládá se, že k ní vede kombinace těžké periferní somatické i autonomní neuropatie s opakovanými, často nepoznanými, drobnými traumaty (mikrofrakturami) při lokální osteoporóze (Obrázek 2). Mikrotrauma vyvolá akutní zánětlivou reakci agravovanou pravděpodobně autonomní neuropatií, která vede k osteolýze a je zodpovědná za vznik aktivního CHOA [57]. Na buněčné úrovni interaguje ligand pro aktivaci receptoru aktivátoru nukleárního faktoru kappa B (RANKL) s RANK receptorem na preosteoklastu a přes nukleární transkripční faktor kappa-B aktivuje osteoklastogenezi. Kostní remodelace je regulována také osteoprotegerinem (OPG), což je glykoprotein secernovaný např. osteoblasty nebo aktivovanými T-lymfocyty. Funguje jako kompetitivní inhibitor pro RANKL při jeho excesivní produkci. Koordinovaná syntéza RANKL a OPG je zásadní pro kostní remodelaci. [58]. Vzhledem k přítomnosti těžké neuropatie pacient nadále zatěžuje kost postiženou aktivní CHOA, což vede k opakovanému mikrotraumatu a progresivní osteolýze. Bylo prokázáno zvýšení počtu monocytů a jejich cytokinů a zároveň přítomnost atypických monocytů v plasmě u pacientů s CHOA oproti kontrolní skupině diabetiků [59]. Osteoklasty produkované vlivem RANKL u pacientů s CHOA, pěstované in vitro, jsou agresivnější a mají vyšší resorpční aktivitu v porovnání s kontrolní skupinou. Tyto procesy jsou však jen částečně inhibovány OPG, což podporuje předpoklad, že i jiné mediátory mohou hrát důležitou roli [60].



Obr. 2. Patogeneze Charcotovy osteoarthropatie

1.2.3.3 Diagnostika

K základům diagnostiky CHOA patří klinické podezření na toto onemocnění, zejména v aktivním stádiu. Za patognomický se pokládá průkaz neuropatie a rozdíl kožní teploty mezi postiženou a nepostiženou končetinou větší než 2°C [61, 62]. Problémem je longitudinální sledování ústupu aktivity procesu důležité pro nutnost imobilizace pacienta ortézou nebo sádkou. RTG není schopno rozlišit CHOA od osteomyelitidy. Magnetická rezonance (MR) může odlišit infekci v měkkých tkáních od kostní remodelace při CHOA, tato metoda je však hůře dostupná. Velkým omezením MR jsou také vysoké nároky na zkušenost při hodnocení nálezů. K rozlišení CHOA od osteomyelitidy se používají také radioizotopové metody, které se vyznačují vysokou senzitivitou, ale nižší specificitou. Tyto metody ale popisují nálezy kvalitativně a nelze je používat k hodnocení ústupu aktivity kostního procesu.

2 Cíle dizertační práce

Ovlivnění lokálních procesů při hojení ran jsme zkoumali ve 2 studiích. Cílem jednotlivých studií bylo:

- 1) Zhodnotit nové materiály vyráběné bezjehlovou nanotechnologií jako potenciální buněčné nosiče z hlediska jejich efektu na hojení ran v experimentu (**studie 1**)
- 2) Porovnat terapeutický efekt acellulární porcinní dermis a porcinních xenotransplantátů (**studie 2**)

Problematiku **terapeutické vaskulogeneze ICHDK u syndromu diabetické nohy** jsme zkoumali ve 4 studiích. Cílem jednotlivých studií bylo:

- 1) Posoudit mechanismus účinku KB získaných dvěma různými metodami (z kostní dřeně a z periferní krve po stimulaci G-CSF) na lokální vaskulogenezi a porovnat s efektem konzervativní léčby (**studie 3**)
- 2) Zhodnotit vztah sérových hladin pro- a anti-angiogenních cytokinů k lokální vaskulogenezi a množství aplikovaných KB a jejich vztah k riziku systémové vaskulogeneze (**studie 4**)
- 3) Posoudit možnosti scintigrafie lýtkových svalů pomocí ⁹⁹Tc MIBI při vizualizaci lokální vaskulogeneze po aplikaci KB (**studie 5**)
- 4) Porovnat účinnost terapeutické vaskulogeneze KB se standardní metodou revaskularizace (PTA) - (**studie 6**)

Vliv infekce na recidivu ulcerací u syndromu diabetické nohy jsme hodnotili v jedné studii. Jejím cílem bylo:

Zhodnotit výskyt a rizikové faktory reulcerací se zaměřením na osteomyelitidu během 3-letého sledování po zhojení syndromu diabetické nohy (**studie 7**)

Patologické procesy v oblasti kostního metabolismu u Charcotovy osteoarthropatie jsme analyzovali v jedné studii, jejímž cílem bylo:

Definovat kvantitativní scintigrafické parametry vhodné k hodnocení aktivity Charcotovy osteoarthropatie na podkladě jejich změn v průběhu léčby a na podkladě korelací s parametry kostní remodelace (**studie 8**)

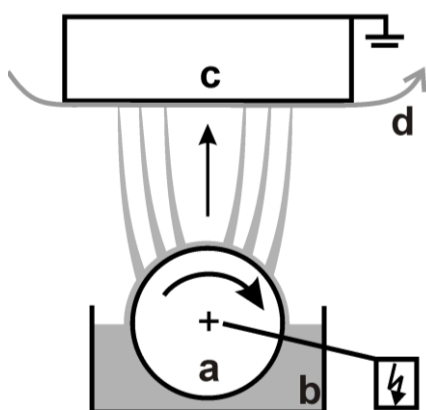
3 Vybrané metodiky jednotlivých studií

3.1 Výroba nanovláken (studie 1)

Nanovláknna byla vyrobena za použití Nanospider™ technologie založené na rotující spinningové elektrodě a vznikajícímu silnému elektrostatickému poli (Obrázek 3).

Želatina (porcinní, typ B, Sigma, St. Louis, MO, USA) byla rozpuštěna v 80 % kyselině octové (Penta, Praha, ČR). U elektrospinningu byly použity tyto parametry: vzdálenost elektrody 15 cm, voltáž 5,9 kV/cm, teplota do 25 °C a vlhkost do 35 %. Pro zvýšení odolnosti vůči vodě byl proveden crosslink nanovláken ihned po produkci, u želatiny byly použity páry glutaraldehydu (Sigma).

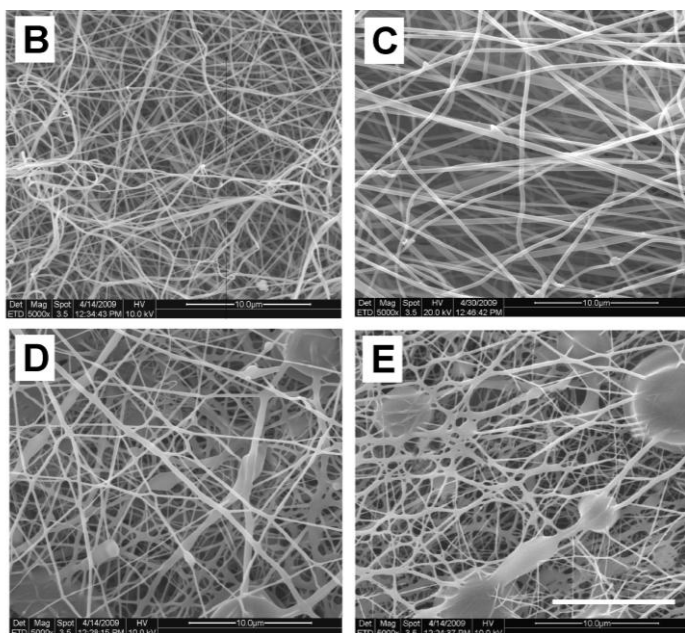
Poly-ε-caprolakton – PCL (Mw ~ 80 kDa, Sigma) byl rozpuštěn ve směsi tetrahydrofuranu a dimethylformamidu (Penta) v poměru 1:1. U elektrospinningu byly použity tyto parametry: vzdálenost elektrody 16-20 cm, voltáž 5,5 kV/cm, teplota do 30 °C a vlhkost do 35 %.



Obr 3. Schéma bezjehlové technologie založené na rotující spinningové elektrodě. Kovový navíječ jako pozitivní elektroda (a), rezervoár roztoku polymeru s vrstvou formující vlákna (b), kolektor (c), textilní substrát – podpůrný materiál (d). (Dubský et al., J Mater Sci Mater Med, 2012)

3.1.1 Příprava nanovláken a kultivace buněk

Z nanovláken byl dále odstraněn podpůrný substrát, byla nařezána na čtverce 1,5 x 1,5 cm, sterilizována z obou stran UV zářením a fixována v CellCrown™ roztoku (Scaffdex, Tampere, Finsko). Vzhledem k možnosti přetrvávání toxických monomerů a rozpouštěděl ve finálním nanovláknenném produktu, bylo provedeno vymytí destilovanou vodou před nasazením buněk. K zajištění nanofibrózní struktury ve vodě byly vzorky vloženy do Petriho misek a promíchány s deionizovanou vodou po dobu 7 dní s každodenní výměnou vody. Vzorky pak byly vysušeny při teplotě 40-50 °C (Obrázek 4).



Obr. 4. Obrázky z elektronového mikroskopu: před – želatina (B) a PCL (C) a 7 dní po promíchání s deionizovanou vodou – želatina (D) a PCL (E). (Dubský et al., *J Mater Sci Mater Med*, 2012)

Lidské mesenchymální buňky byly odebrány z kostní dřeně zdravých dárců, vloženy do fyziologického roztoku s fosfátovým pufrem (PBS) a centrifugovány. Dále byla provedena jejich kultivace na Dullbekem modifikovaném Eaglově mediu (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Rakousko) s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS) a PrimocinemTM. K experimentu byly použity pasáže 3-4; lidské mesenchymální buňky byly dále analyzovány průtokovou cytometrií jako CD34, CD45, CD235 a CD271 negativní a CD29, CD44, CD73, CD90 a CD105 pozitivní.

Lidské fibroblasty a lidské epidermální keratinocyty byly získány ze zbytkové kůže při plastické chirurgii. Kus kůže velikosti 3 cm², šířky 0,3 mm, byl inkubován v 0,25 % trypsinu po dobu 3 hod při 37 °C, vložen do kultivačního média a promíšen. Lidské fibroblasty (4. pasáž, denzita 2x10⁴ buněk/cm²) byly kultivovány ve standardním mediu obsahujícím HMEM, 0,12g/l sodiu pyruvát, 1 g/l NaHCO₃, 10 % bovinní sérum a 1 % FBS. Lidské keratinocyty (3. pasáž, denzita 5x10⁴ buněk/cm²) byly kultivovány na vrstvě letálně ozářených NIH-3T3 buněk ve standardním mediu obohaceném o 0,12 IU/ml insulin (NOVO Nordisk, Bagsvaert, Dánsko), 5 µg/ml hydrocortizon, 10⁻¹⁰ M. cholera toxin and 5 ng/ml epidermální růstový faktor (Sigma).

Pro vizualizaci buněčné morfologie byly kultury buněk fixovány ve 4 % paraformaldehydu na 15 min a vymyty pomocí PBS. K zobrazení F-aktinu byly buňky inkubovány s Alexa-Fluor 568 Phalloidinem (Molecular Probes, Invitrogen, Paisley, UK)

3.2 Izolační metody a aplikace kmenových buněk (studie 3-6)

3.2.1 Izolace kmenových buněk z kostní dřeně

V rámci testování optimální metody odběru a zpracování kostní dřeně byla izolace kmenových buněk z kostní dřeně prováděna 2 metodami:

3.2.1.1.1 Metoda izolace kmenových buněk z kostní dřeně s použitím systému Harvest Technologies Corp.

Nejprve byla na operačním sále zavedena svodná (epidurální) anestezie, dle stavu pacienta případně analgosedace. Následně byl v poloze na břiše proveden odběr kostní dřeně standardní Jamshidiho technikou v celkovém objemu 2x120 ml (z obou lopat kyčelních kostí). Celkový objem 240 ml odebrané kostní krve byl ve 400 ml vaku promíchán s 30 ml antikoagulans, dále přes infuzní set s filtrem aspirován do 4x60 ml stříkaček. Celkový objem byl přenesen do separačních nádobek a separován gradientní denzitní centrifugací během 14 minut systémem Harvest Technologies Inc. Po této separaci byla ze separačních nádobek aspirována plasma a následně odebrán koncentrát kostní dřeně o celkovém objemu 40 ml.

3.2.1.1.2 Metoda izolace kmenových buněk z kostní dřeně sedimentací s gelofusinem

Odběr kostní dřeně proběhl stejně jako u předchozí metody, celkový odebraný objem byl cca 350 - 400 ml kostní krve, který byl následně ve vaku promíchán s antikoagulans a dále zpracován sterilním způsobem v laminárním boxu. Po odběru vzorku na stanovení buněčnosti byl ke kostní dření přidán gelofusin (látko, v jejíž přítomnosti rychleji sedimentují erytrocyty a jaderné buňky zůstávají v supernatantu v plasmě) tak, aby jeho konečná koncentrace byla 25%. Sedimentace trvá 20 – 60 minut, dokud se nevytvoří rozhraní mezi erytrocyty a plazmou (Obrázek 5). Plazma s leukocyty byla převedena do transferového vaku (Grifols - 600ml) a centrifugována 15 minut při 1600rpm. Po centrifugaci pomocí plasma-extraktoru jsme převedli plasmu zpět k erytrocytům a sedimentované buňky byly v konečném objemu 40-90 ml připraveny k aplikaci.



Obr 5. Sedimentace kostní dřeně pomocí gelofusinu v laminárním boxu

3.2.2 Izolace kmenových buněk z periferní krve

Výdej KB ze dřeně byl stimulován 3-5 dní granulocyty-kolonie stimulujícím faktorem (G-CSF, filgrastim, Neupogen™) v dávce 5-8 $\mu\text{g/kg/den}$. Po dosažení dostatečné koncentrace CD34+ buněk v periferní krvi (více než $2 \times 10^6/\text{l}$) byla provedena separace periferních kmenových buněk pomocí 4-hodinové leukaferézy v intermitentním režimu s recirkulací na přístroji Haemonetics+.

3.2.3 Aplikace buněčné suspenze

Celkové množství 40-90 ml buněčné suspenze získané některou z výše popsaných metod bylo na operačním sále rozděleno do 2 ml stříkaček a po desinfekci končetiny aplikováno hluboce do svalů lýtky a nohy v průběhu bérkových tepen 40-50 vpichy po 1-2 ml a cirkulárně kolem místa defektu (Obrázek 6). Po aplikaci byla končetina šetrně omyta fyziologickým roztokem a zabandážována. Pacient byl dále sledován následující 3 dny z hlediska akutních komplikací.



Obr 6. Aplikace buněčné suspenze do lýtkového svalu

3.3 Stanovení CD34+ buněk a sérových hladin angiogenních cytokinů (studie 4)

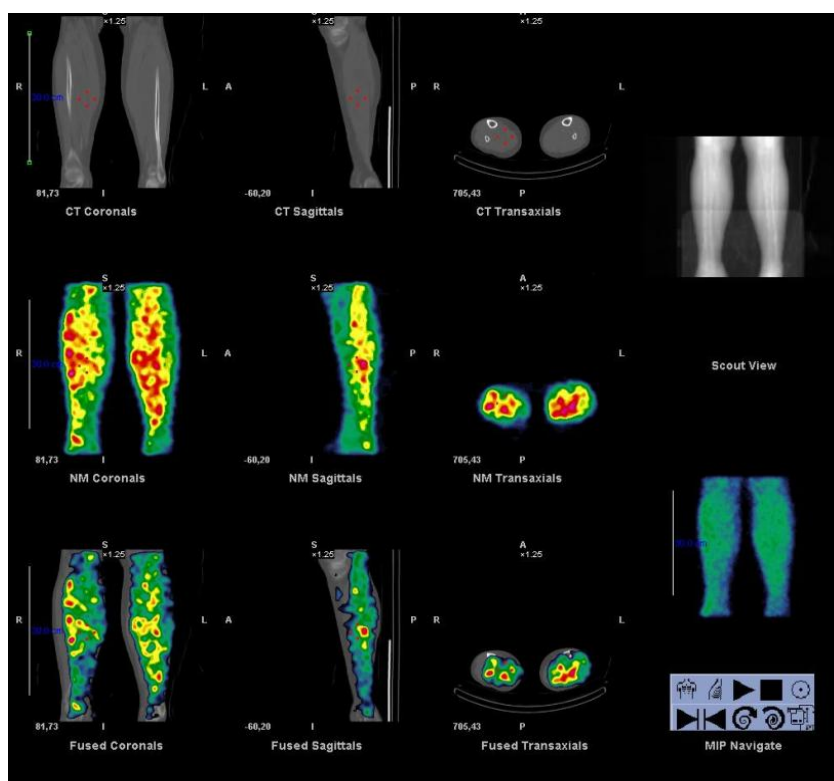
Krev pacientů byla odebrána při hospitalizaci na Klinice diabetologie nebo při ambulantní návštěvě a odeslána do imunologické laboratoře, kde byla na průtokovém cytometru (FACS – Fluorescence-activated cell sorting). Na dalším vzorku byla po 30-60 min stání v teplotě 2-6°C byla provedena centrifugace rychlostí 4300 otáček/min, při teplotě 4°C po dobu 10 min. Sérum bylo dále postupně zmrazeno na skladovací teplotu -80°C. Po nasbírání dostatečného počtu vzorků byla séra rozmrazena a stanovena metodou Luminex (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) pomocí Fluorokine MAP Human Angiogenesis Custom Premix Kit A (R & D Systems), který obsahoval 5 pro-angiogenních cytokinů (Vascular Endothelial Growth Factor, basic Fibroblast Growth Factor, Angiopoietin-1, Platelets-derived Growth Factor-AA a BB) a jeden endogenní inhibitor angiogeneze (Endostatin). Minimální detekční hladiny pro každý cytokin byly: VEGF: 11,5 pg/ml, b-FGF: 11,8 pg/ml, Angiopoietin-1: 185,2 pg/ml, PDGF-AA: 10,2 pg/ml, PDGF-BB: 28,4 pg/ml a Endostatin: 123,5 pg/ml.

50 mikrolitrů séra bylo smícháno s mikropartikulí specifické protilátky a inkubováno po dobu 3 hodin při pokojové teplotě s postupnou pokračující agitací. Po prvním promytí byla přidána detekční protilátka pro každý analyt a provedena další inkubace na 1 hodinu na horizontálním vortexu. Po druhém promytí byl přidán phycoerythrinem-konjugovaný streptavidin a provedena další inkubace na 30 min na vortexu při pokojové teplotě. Po finálním promytí byly vzorky ihned změřeny na zařízení Luminex. Výsledky byly vypočítány interpolací z příslušných standardních křivek.

3.4 Dynamická scintigrafie lýtkových svalů k posouzení účinnosti buněčné terapie syndromu diabetické nohy (studie 5)

Perfuzní scan lýtkových svalů byl proveden za použití radioizotopu ^{99m}Tc Technetium – methoxyisobutylisonitrilu (^{99m}Tc MIBI) před a 2 měsíce po terapii KB a byl korelován s hodnotami TcPO_2 jakožto standardem pro neinvazivní hodnocení mikrocirkulace za stejné období. Scintigrafické vyšetření bylo provedeno gamma kamerou a data byla dále zpracována speciálním softwarem (SMV DST-XL, Twistburg, OH, USA). Celotělové snímky byly zaznamenány současně z předního i zadního pohledu kamery, poté bylo provedeno SPECT (single photon emission computer tomography) a CT vyšetření.

Po aplikaci 4 MBq/kg ^{99m}Tc -MIBI byl proveden celotělový scan a SPECT/CT a změřena klidová četnost (rest count – RC) lýtkového svalu (Obrázek 7). Poté pacient provedl cvičení (60x flexi a extenzi v kotníku) a následně byl aplikován bolus 8 MBq/kg ^{99m}Tc -MIBI a byla změřena námahová četnost (exercising count – EC). Ve 30 cm úseku byla sečtena četnost v transverzálních řezech v zájmových oblastech nad každým bérce – jednalo se tedy o četnost v 3D prostoru. Dále byla stanovena tzv. perfuzní rezerva (perfusion reserve – PR), která byla vypočítána podle vzorce $(EC - RC) / RC \times 100$ a udávána v procentech.



Obr 7. Ukázka sumačního snímku SPECT/CT lýtkového svalu – červená barva značí největší perfuzi, modrá nejmenší

4 Přehled studií

4.1 Patologické procesy v oblasti hojení ran

4.1.1 Studie 1: Posouzení nanovláken vyráběných bezjehlovou technologií elektrospinningu v hojení ran izolovaně i jako potenciální nosiče kompetentních buněk pro přípravu lokálních krytí (Přílohy 1-3)

Účinnou moderní terapií povrchových defektů u SDN jsou dvojrstevné kultivované kožní deriváty. Hlavní jejich nevýhodou je však vysoká cena a limitovaná dostupnost. Použití biopolymerních nanovláken nabízí potenciální levnější variantu lokální terapie chronických ran. Nanovlákná vyráběná bezjehlovou technologií elektrospinningu jsou vysoce porózní, připomínají strukturou extracelulární matrix a podporují buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci.

Cílem naší práce bylo jednak zhodnotit želatinová (GEL) a poly- ϵ -caprolaktonová (PCL) nanovlákná jako potenciální nosiče buněk v první části experimentu a dále porovnat jejich efektivitu na hojení ran s kontrolní skupinou u potkanů ve druhé části experimentu.

Hypotéza: Nanovlákná vyráběná bezjehlovou biotechnologií jsou vhodným materiálem jako nosiče buněk a mohou být účinné při hojení ran ve srovnání s aktivním komparátorem.

Schéma studie a metody

První část experimentu probíhala in vitro a věnovala se porovnání buněčné viability, růstu a adheze lidských mesenchymálních buněk, lidských dermálních fibroblastů a lidských keratinocytů na různých typech nanovláken.

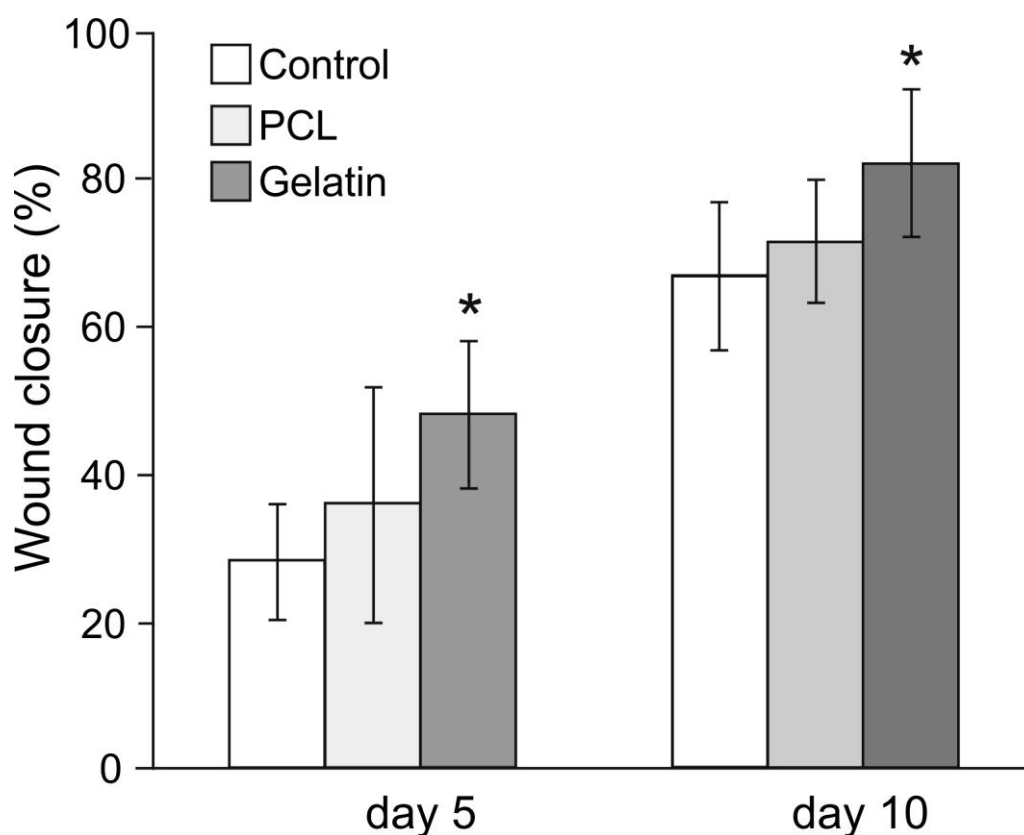
Druhá část experimentu probíhala in vivo na modelu rány u potkana a zabývala se hojením ran po aplikaci jednotlivých materiálů (GEL a PCL) a histologickou analýzou rány po aplikaci jednotlivých nanovláken a u kontrolní skupiny (gáza). Hojení ran bylo hodnoceno měřením redukce plochy defektu a histologickým vyšetřením u 5 potkanů v každé skupině (GEL a PCL) a porovnáno s kontrolní skupinou (gáza). Histologie spodiny rány s hodnocením defektu epitelálního krytu - lineárního (LG) a polygonálního epitelálního „gap“ (PG), zánětu a angiogeneze byla provedena po 5 a 10 dnech.

Nanovlákná byla vyrobena za použití NanospiderTM technologie založené na rotující spinningové elektrodě (viz Vybrané metodiky).

Výsledky studie

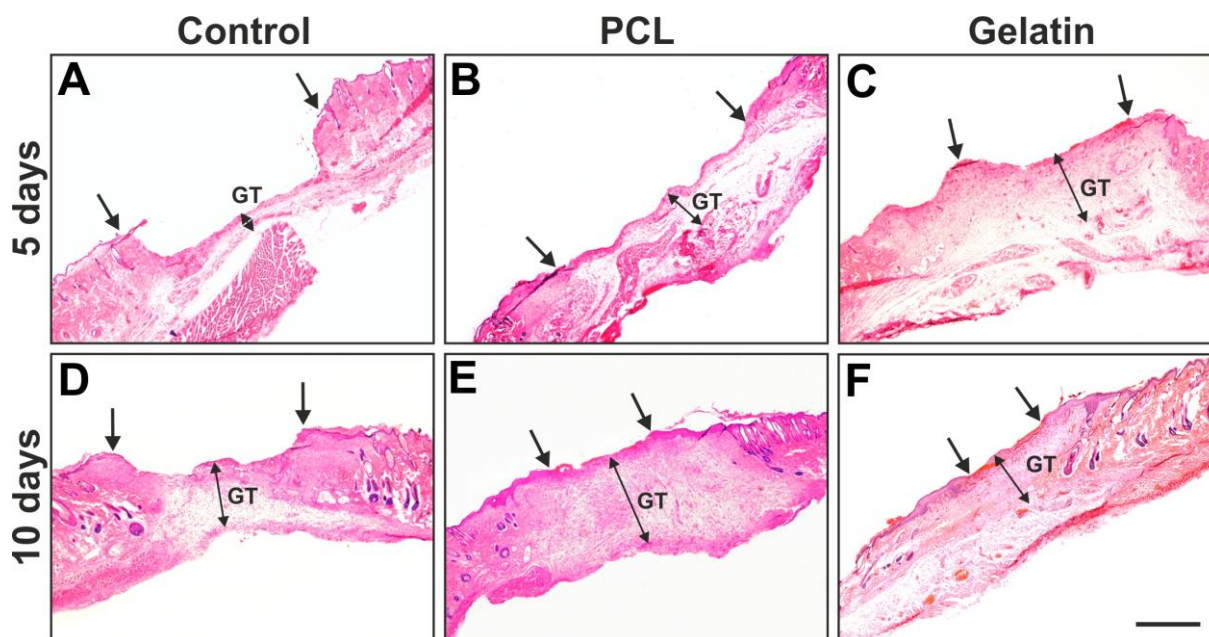
V první části experimentu in vitro nebyly zjištěny rozdíly mezi oběma typy nanovláken a kontrolou (standardní kultivační materiál) v buněčné viabilitě, adhezi a proliferaci u žádné z populací testovaných lidských buněk (mesenchymální buňky, keratinocyty a fibroblasty).

Na modelu rány in vivo u potkana jsme pozorovali signifikantně rychlejší hojení rány u terapie nanovláknů typu GEL ve srovnání s kontrolou ($p < 0,05$) po 5 i 10 dnech, hojení ve skupině nanovláken PCL bylo bez signifikantního rozdílu oproti kontrole (Obrázek 8).



Obr 8. Rychlost hojení rány po 5 a 10 dnech. (Dubský et al., *J Mater Sci Mater Med*, 2012)

Významně rychlejší epitelizace byla pozorována ve skupině GEL, což vedlo k významně užšímu lineárnímu i polygonálnímu epiteliálnímu „gap“ v den 5 a den 10, dále byla pozorována signifikantně silnější granulační tkáň ve skupině GEL v den 5 oproti ostatním skupinám (Obrázek 9). Výraznější angiogeneze hodnocená semikvantitativně byla pozorována v den 5 ve skupině GEL a v den 10 ve skupině PCL. Přítomnost zánětu se nelišila mezi jednotlivými skupinami, přítomnost akutního zánětu ani reakce na cizí těleso nebyly pozorovány v žádné skupině.



Obr 9. Histologie (H&E) v den 5 (A, B, C) a 10 (D, E, F). Šipkami označena tloušťka granulační tkáně (GT) a okraj defektu, kde není vytvořena nová epidermis. Rozsáhlý epiteliální „gap“ a tenká granulační tkáň v kontrolní skupině (A) a PCL skupině v den 5 (B). V GEL skupině (C) byl v den 5 pozorován menší „gap“ a silnější GT v porovnání s kontrolou. Kratší „gap“ pozorován v GEL skupině (F) i v den 10. Měřítka: 1 mm. (Dubský et al., J Mater Sci Mater Med, 2012)

Diskuse ke studii

Naše studie prokázala výhodné vlastnosti želatinového nanovlákná produkovaného bezjehlovou technologií elektrospinningu z hlediska buněčné proliferace, růstu a adheze a také z hlediska rychlejšího hojení ran prokázaného histologicky.

Bezjehlová technologie elektrospinningu nabízí oproti klasické jehlové technice výroby nanovláken výhodu kontinuální produkce a tedy lepší využití v průmyslu a medicíně [63]. Nevýhodou této technologie je však riziko zmnožení residuálních monomerů v nanovláknenném materiálu při nedokonalé výrobě, které by mohlo vést k cytotoxicitě. Tyto cytotoxické substance však mohou být efektivně odstraněny při vymytí destilovanou vodou. V této studii jsme použili Nanospider™ technologii k přípravě želatinových a PCL nanovláken, vyšší poróza a specifický povrch byl pozorován u želatinových nanovláken.

Všechny typy kultivovaných buněk hrajících důležitou roli při hojení ran (mesenchymální buňky, keratinocyty a fibroblasty) rostly a proliferovaly na obou typech nanovláken, čímž jsme prokázali, že materiály nejsou cytotoxické a mohly by sloužit jako potenciální nosiče pro lokální bunečnou terapii.

Efekt nanovláken na hojení ran byl hodnocen v modelu kožní rány potkana dosahující svalové fascie. GEL nanovlákná, ale nikoli PCL vedly k akceleraci hojení ran zvýšenou epitalizací a formací granulační tkáně v porovnání s kontrolní skupinou léčenou gázou. Histologická analýza neprokázala zvýšení depozit kolagenu v granulační tkáni, jejíž tloušťka progresivně nerostla během hojení; tento nálezn vyvrací potenciální možnost vzniku patologické fibrózy nebo jizvení po terapii nanovláknny [64]. Po terapii GEL bylo pozorováno rychlejší hojení rány a zvýšená epitelizace a formace granulační tkáně, PCL se však významně nelišilo od kontrolní skupiny. Tato diskrepance může být způsobena rozdílnou

vnitřní strukturou jednotlivých nanovláken (celkový objem pórů a specifický povrch, který je menší u PCL). Ke zlepšení biologických vlastností se nyní vyvíjejí kompozitní nanovlákná s další přírodní komponentou např. PCL/kolagen, PCL/želatina nebo poly-lakto-ko-glykolová kyselina (PPLA)/želatina a další [65].

Výsledky naší studie ukázaly, že želatinová nanovlákná produkovaná bezjehlovou technologií elektrospinningu jsou dobrým nosičem lidských buněk a potenciálním novým lokálním materiálem urychlujícím hojení ran. Efektivita poly-ε-caprolaktonových nanovláken se však výrazněji nelišila od kontrolní skupiny.

4.1.2 Studie 2: Acellulární porcinní dermis v léčbě syndromu diabetické nohy a její porovnání s xenogenními transplantáty (Přílohy 4-6)

V lokální terapii SDN jsou dlouhodobě používané porcinní xenotransplantáty (XENO), které spolu s nově vyvinutou acellulární porcinní dermis (APD) představují dostupnější a levnější varianty k terapii vícevrstevnými kožními deriváty.

Cílem naší práce bylo porovnat terapeutický efekt acellulární porcinní dermis a porcinních xenotransplantátů

Hypotéza: Nové materiály vyráběné biotechnologií (např. acellulární porcinní dermis) urychlují hojení ran ve srovnání s aktivním komparátorem.

Charakteristika souboru

Do této retrospektivní studie byli zařazeni pacienti se syndromem diabetické nohy z podiatrické ambulance Centra diabetologie IKEM léčení v letech 2005-2008 pro chronické, alespoň 2 měsíce se nehojící defekty dolních končetin (dle mezinárodní Texaské klasifikace [66] stupně IA, IIA, IC, IIC). Vyloučení byli pacienti s klinickými známkami těžké infekce (silně povleklá spodina defektu, sekrece hnisu z rány, flegmóna), pacienti s osteomyelitidou (stanovenou dle RTG snímku) a prokázanou těžkou ischemií (index kotník paže < 0,6 nebo měření transkutánní tenze kyslíku < 25 mm Hg). Pacienti s pozitivním kultivačním nálezem stěru z rány, ale bez klinických známek infekce, byli zařazeni. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií, která byla schválena lokální etickou komisí.

	XENO	APD	p
Počet pacientů	28	14	
Věk (roky)	58,7 ± 12	53,8 ± 8,2	NS
Trvání diabetu (roky)	23,7 ± 14,6	16,9 ± 11,9	NS
Chronická renální insuficience (%)	17,9	21,4	NS
Hemodialýza (%)	14,3	14,3	NS
Stav po transplantaci (%)	10,7	7,1	NS
ICHS (%)	35,7	42,8	NS
ICHDK (%)	57,1	64,3	NS
Stav po CMP (%)	7,1	7,1	NS
Trvání defektu (měsíce)	5,9 ± 2,9	6,2 ± 3,6	NS
Velikost defektu (cm ²)	5,66 ± 4,0	6,73 ± 4,71	NS

Tab 1. Vstupní charakteristiky pacientů ve zkoumané a kontrolní skupině

Schéma studie

Skupinu zkoumanou (léčenou APD) tvořilo 14 pacientů se syndromem diabetické nohy. APD byla před použitím jemně meshována, vložena do fyziologického roztoku a následně sterilně aplikována na ránu v rozsahu mírně přesahujícím okraje rány. Vzhledem k tomu, že APD samotná nemá žádnou antibakteriální aktivitu, vždy jsme ji překrývali mastným tylem s chlorhexidinem.

Do kontrolní skupiny (léčené XENO) bylo zahrnuto 28 pacientů se SDN. XENO byly vepřové kožní štěpy, dodávány kožní bankou, před použitím vyprány v teplém fyziologickém roztoku po dobu 15 minut a dále ihned přiloženy na rannou plochu (zbytky glycerolu v tkáni působí v průběhu hojení defektu antimikrobiálně a nejsou na závalu).

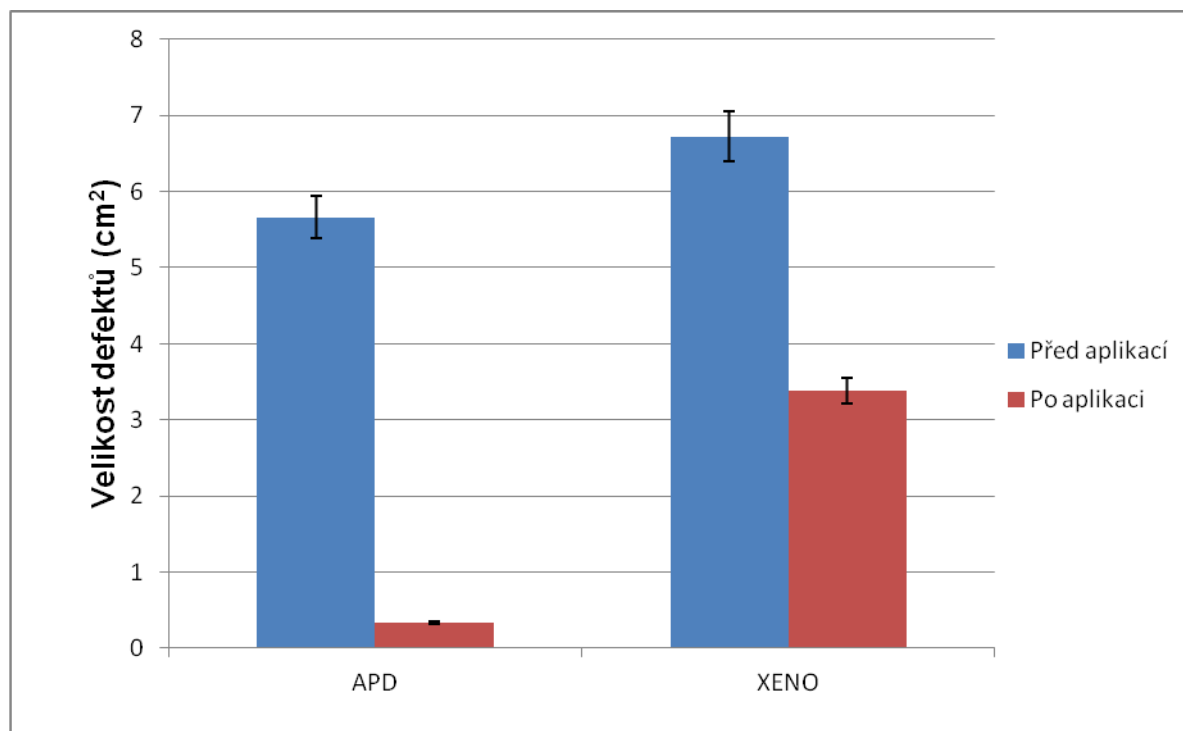
V obou skupinách byla porovnávána redukce plochy defektu, doba aplikace a případné nežádoucí účinky. Terapie oběma typy krytí byla prováděna buďto do podstatného zlepšení lokálního nálezu nebo naopak byla přerušena při zhoršení lokálního nálezu nebo neúčinnosti.

Výsledky studie

Ve zkoumané skupině léčené APD došlo k signifikantní redukci plochy ulcerace ($p = 0,0001$) oproti kontrolní skupině léčené XENO ($p = 0,06$; Obrázek 10). Medián redukce plochy ulcerace byl větší ve zkoumané skupině oproti skupině kontrolní (96,3 [27; 100] % vs. 48,5 [-33,3; 97,5] %, $p < 0,001$). Rychlost redukce plochy za týden byla v obou skupinách srovnatelná ($p = 0,137$; NS).

Kultivační nálezy před aplikací a po skončení aplikace byly bez významného rozdílu: 14,3 % pacientů ze zkoumané skupiny a 6,2 % pacientů z kontrolní skupiny vykazovalo pozitivní kultivační nález meticillin-oxacillin rezistentní staphylococcus aureus (MRSA), rozdíl nebyl statisticky signifikantní.

Z hlediska nežádoucích účinků byly ve zkoumané skupině ve 2 případech pozorovány mírné hypergranulace, u 2 pacientů z kontrolní skupiny musely být xenotransplantáty předčasně odstraněny – pro progresi lokálního nálezu na dolní končetině.



Obr 10. Redukce plochy defektu v obou skupinách. (Dubský et al., Prakt Lek, 2010)

Diskuse ke studii

V naší studii jsme pozorovali rychlejší hojení ran u pacientů léčených APD v porovnání s pacienty léčenými XENO bez závažných nežádoucích účinků.

Naše výsledky se shodují s výsledky multicentrické studie zabývající se terapií lidskou acelulární dermální matrix [67] provedené u 75 diabetiků – tato studie prokázala plnou epitelizaci u 91 % defektů po 7 týdnech od začátku terapie. Indikováni byli i pacienti s hlubšími defekty penetrujícími ke kloubnímu pouzdru (dle mezinárodní klasifikace Texas IIIB-D) a nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými stupni Texaské klasifikace.

V současnosti existuje několik variant uměle vyrobených kožních náhrad. Jedním z prvních byla kožní náhrada obsahující kultivované keratinocyty v polyglactinu (tzv. Dermagraft). Po dvoutýdenní kultivaci při kontaktu s ránou produkují tyto buňky růstové faktory, cytokiny a proteiny extracelulární matrix a podporují formování nové epidermis [68]. V této studii bylo po terapii Dermagrafem prokázáno signifikantně rychlejší dosažení 50 % redukce plochy defektu ve srovnání s kontrolní léčbou gázou s fyziologickým rozotkem ($p = 0,03$). Multicentrická randomizovaná studie [69] na 208 pacientech prokázala účinnější a rychlejší hojení při použití jiného typu BBSS - Graftskinu ve srovnání s kontrolní skupinou. Indikováni byli pacienti s povrchovějšími ulceracemi bez známek ischemie a infekce. Po 12 týdnech došlo ke zhojení 56 % pacientů léčených Graftskinem oproti 36 % pacientů léčených kompresivní terapií ($p = 0,0042$).

Mezi hlavní výhody APD patří dobrá dostupnost, skladovatelnost v sušeném stavu a bezpečnost. Výhledově je také nadějným materiálem, který by mohl sloužit jako podklad pro kultivované keratinocyty nebo autologní KB. XENO nejsou v současnosti dále využívány zejména pro jejich horší dostupnost při soustředění výroby do několika málo kožních bank.

Výsledky naší studie ukázaly, že APD je u vhodných typů ran u pacientů se SDN účinná metoda lokální léčby, která je levnější a dostupnější než léčba speciálními bioinženýrsky kultivovanými kožními deriváty. Redukce velikosti ulcerací při léčbě APD byla v naší studii větší než při léčbě xenotransplantáty.

4.2 Terapeutická vaskulogeneze u ischemické choroby dolních končetin a syndromu diabetické nohy

4.2.1 Studie 3: Porovnání efektu dvou různých metod izolace autologních kmenových buněk (z kostní dřeně nebo z periferní krve po stimulaci kostní dřeně) u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a syndromem diabetické nohy (Přílohy 7-9)

Standardní léčba kritické končetinové ischemie u pacientů se SDN nemusí být dostatečně účinná až u jedné třetiny pacientů z důvodů zdravotního stavu, technických nebo nálezu na angiografii. Autologní buněčná léčba je novou metodou léčby těchto pacientů.

Cílem této studie bylo posoudit mechanismus účinku KB získaných dvěma různými metodami (z kostní dřeně a z periferní krve po stimulaci G-CSF) na lokální vaskulogenezi a porovnat s efektem konzervativní léčby.

Hypotéza: Mechanismus účinku lokální vaskulogeneze je obdobný u dvou metod získávání suspenze KB (buněk získávaných z kostní dřeně nebo z periferní krve po stimulaci G-CSF), a proto není rozdíl v jejich účinnosti u pacientů se SDN a jsou účinnější než konzervativní terapie.

Schéma studie a charakteristika souboru

28 pacientů se syndromem diabetické nohy a kritickou končetinovou ischemií (definovanou jako $TcPO_2 < 30$ mm Hg) s nemožností provedení standardní revaskularizace z podiatrické ambulance IKEM bylo v letech 2008-2012 konsekutivně zařazeno do aktivní skupiny léčené KB (17 pacientů BMMNC získanými trepanobiopsií lopaty kosti kyčelní, 11 pacientů PBPC získanými z periferní krve po předchozí stimulaci G-CSF). 22 pacientů se stejnými vstupními kritérii léčených za stejné období bylo zařazeno do kontrolní skupiny léčené konzervativně. Pacienti v kontrolní skupině nemohli být léčeni KB z důvodů změn legislativy a dočasného zákazu buněčné terapie SDN Státním ústavem pro kontrolu léčiv.

Pacienti v obou aktivních skupinách (BMMNC a PBPC) a v kontrolní skupině se nelišili v demografických charakteristikách jako věk, průměrný glykovaný hemoglobin, trvání diabetu aj. (Tabulka 2).

Parametr	BMMNC	PBPC	Kontroly	p
Počet pacientů	n = 17	n = 11	n = 22	
Věk (roky)	60,7 ± 9,4	63,4 ± 10,4	63,3 ± 9,1	NS
Pohlaví (% mužů)	88,2	81,8	77,3	NS
Trvání diabetu (roky)	23,1 ± 15,2	21,5 ± 9,4	19,8 ± 9	NS
Glykovaný hemoglobin (%)	7,2 ± 1,1	7,7 ± 1,1	7,7 ± 1,2	NS
ICHs (%)	56,3	45	59	NS
CHRS – dialýza (%)	6,3	9	13,6	NS
Hypertenze (%)	81,2	91	81,8	NS
Kouření (%)	63,5	64	68,2	NS
$TcPO_2$ před léčbou (mm Hg)	16,3 ± 11	16,4 ± 9,8	14,6 ± 9,6	NS

Tab 2. Charakteristiky pacientů ve skupinách léčených BMMNC, PBPC a v kontrolní skupině

Konsekutivně léčení pacienti v aktivní skupině, splňující zařazovací kritéria, byli přiděleni bez randomizace do skupiny léčené BMMNC nebo PBPC s přihlédnutím ke kontraindikacím podání G-CSF nebo separaci periferní krve (hraniční hematologické nálezy, stav po transplantaci, špatná kvalita periferních cév). Buněčná suspenze, získaná jednou z předchozích izolačních metod (viz Vybrané metodiky), pak byla aplikována do svalů lýtky, krátkých extenzorů nohy a do planty postižené dolní končetiny. Výťažnost obou izolačních metod byla hodnocena stanovením mononukleárních dřevňových buněk a CD34+ prekurzorových buněk v končeném produktu. Obě metody byly dále porovnány pomocí měření $TcPO_2$ a výskytem vysokých amputací před aplikací a po 6 měsících od terapie.

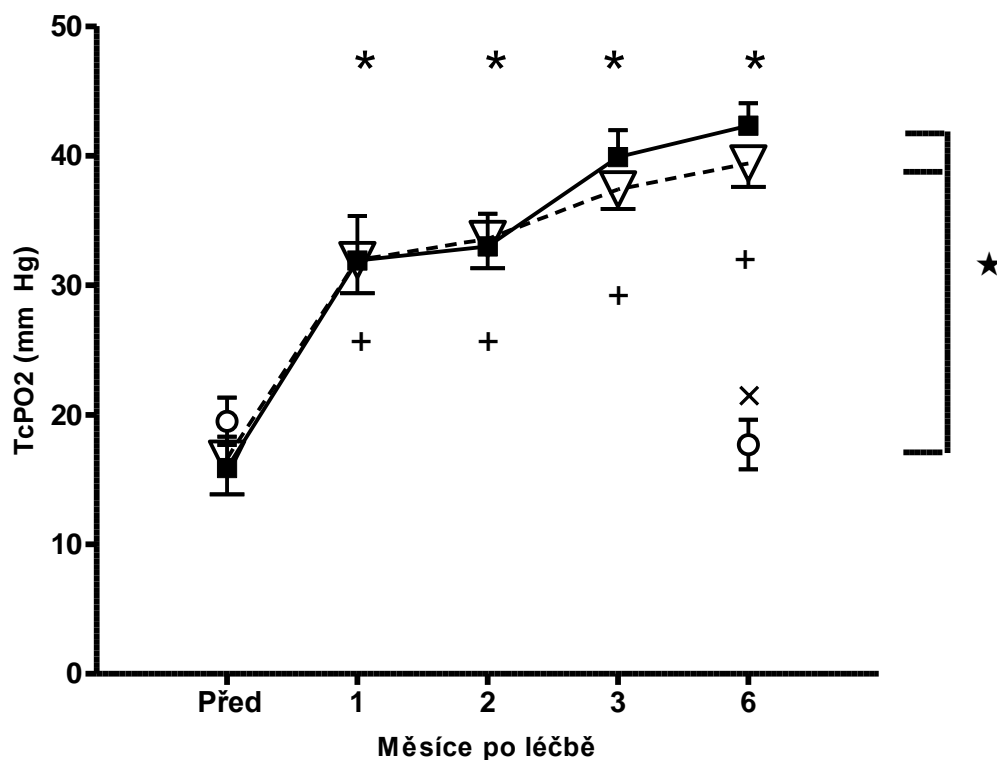
Výsledky studie

Koncentrace CD34⁺ prekurzorových buněk v obou buněčných suspenzích se významně nelišila ($2,2 \pm 1,5 \times 10^7$ vs. $2,4 \pm 2,2 \times 10^7$), bylo však pozorováno signifikantně více celkově aplikovaných mononukleárních buněk ($p = 0,02$) a trombocytů ($p = 0,006$) v suspenzi PBPC oproti BMMNC (Tabulka 3).

Buněčné populace	Celkově aplikované množství	BMMNC (n = 17)	PBPC (n = 11)	p
Objem suspenze (ml)		53,4 ± 11,4	63,6 ± 19,9	0,18
CD34 ⁺ buňky	(x 10 ⁷)	2,2 ± 1,5	2,4 ± 2,2	0,68
Mononukleární buňky	(x 10 ⁹)	1,8 ± 1,3	10,4 ± 7,1	0,02
* Monocyty	(x 10 ⁹)	0,1 ± 0,08	1,6 ± 1,1	0,05
* Lymfocyty	(x 10 ⁹)	0,8 ± 0,5	4,4 ± 2,6	0,04
Neutrofily	(x 10 ⁹)	3 ± 2,6	3,2 ± 1,4	0,42
Trombocyty	(x 10 ⁹)	17,7 ± 16,4	202,1 ± 69,4	0,006

Tab 3. Charakteristiky buněčných suspenzí BMMNC a PBPC

Obě metody izolace KB se signifikantně nelišily ve výskytu vysokých amputací a změnách TcPO₂. Výskyt vysokých amputací do 6 měsíců byl signifikantně nižší u pacientů léčených v aktivní buněčné skupině oproti skupině kontrolní [3/27 (11,1%) vs 10/20 (50 %), $p = 0,009$]. Hodnoty TcPO₂ před léčbou u neamputovaných pacientů v kontrolní skupině se nelišily od BMMNC a PBPC skupin ($19,5 \pm 8,0$; $16,6 \pm 11,5$; $15,9 \pm 10,2$ mm Hg; resp.). Došlo k signifikantnímu vzestupu hodnot TcPO₂ po 1 měsíci u neamputovaných pacientů v obou aktivních skupinách (16 v BMMNC and 11 v PBPC skupině) a tento vzestup přetrvával do 6 měsíců; bez signifikantního rozdílu mezi BMMNC a PBPC skupinami (Obrázek 11). Na druhou stranu hodnoty TcPO₂ mírně poklesly u neamputovaných pacientů z kontrolní skupiny ($n = 10$) po 6 měsících (z $19,5 \pm 8$ na $17,7 \pm 8,1$ mm Hg, $p = \text{NS}$).



- + $p < 0,01$ oproti hodnotám před v BMMNC skupině
- * $p < 0,05$ oproti hodnotám před v PBPC skupině
- × NS oproti hodnotám před v kontrolní skupině
- ★ $p < 0,01$ v obou aktivních skupinách vs. kontroly

Obr 11. Změny TcPO₂ za 6 měsíců po léčbě BMMNC, PBPC a u kontrolní skupiny – bílé kolečko - kontrolní skupina, bílý trojúhelník BMMNC a černý čtverec PBPC. (Dubský et al. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013)

Diskuse ke studii

Nepozorovali jsme signifikantní rozdíl v ovlivnění kritické končetinové ischemie u diabetiků mezi BMMNC a PBPC. Dále jsme prokázali významně vyšší počet vysokých amputací u pacientů v kontrolní skupině léčené konzervativně oproti aktivní skupině léčené KB, tato kontrolní skupina měla obdobný výskyt vysokých amputací, jako se uvádí v Transatlantickém mezioborovém konsensu (TASC II) [70]. Matoba ve své studii popsal záchranu končetiny po léčbě kritické ischemie KB u 60 % pacientů ve 3 letech následném sledování pacientů z původní pilotní studie publikované Tateishim [25, 71].

V obou aktivních skupinách došlo k signifikantnímu vzestupu hodnot TcPO₂ po 6 měsících, v kontrolní skupině byl zaznamenán mírný pokles hodnot TcPO₂. Podobné výsledky pozoroval Walter v randomizované studii, kdy u skupiny pacientů incičiálně léčených placebem po změně na léčbu BMMNC došlo k signifikantnímu vzestupu TcPO₂ po 3 měsících, u pacientů nadále léčených placebem se hodnoty TcPO₂ nezměnily [72]. Průměrný vzestup TcPO₂ po terapii BMMNC a PBPC byl vyšší v naší studii v porovnání průměrným vzestupem uváděným publikovaných metaanalýzách (vzestup o 25,5 a 26,4 mm

Hg oproti 15 mm Hg) [19, 34, 36, 73]. Huang et al. [74] rovněž srovnával efekt BMMNC a PBPC na ischemii dolních končetin a neprokázal rozdíl v klinické účinnosti obou metod. Jeho studie se lišila od naší v počtu pacientů s diabetem (66 vs. 100 %) a ve vyšších vstupních hodnotách TcPO₂ (29 vs. 15,4 mm Hg). V naší studii jsme také pozorovali vyšší vzestup TcPO₂ což může být způsobeno delším následným sledováním v naší studii (3 vs. 6 měsíců) a nižšími vstupními hodnotami TcPO₂ v naší studii.

Celkové množství aplikovaných CD34+ buněk bylo srovnatelné u obou typů izolace KB. Dle dostupných literárních údajů však zatím není jasné, která buněčná subpopulace je zodpovědná za arteriogenezi po intramuskulární aplikaci autologních prekursorových buněk. Naopak kombinace různých typů buněk a růstových faktorů může vést k interakci a zesílení vaskulogenního efektu [75]. Terapie těžké končetinové ischemie pomocí monocytárních buněk z kostní dřeně nebo stimulované periferní krve byla prokázána jako účinnější než terapie frakcionovanými prekursorovými subpopulacemi jako např. CD133+ [76] nebo purifikovanými CD34+ z periferní krve po mobilizaci G-CSF [77]. Dále jsme zjistili signifikantně více mononukleárních buněk a trombocytů v PBPC buněčné suspenzi oproti BMMNC. Tento rozdíl může být způsoben odlišnou metodikou při separaci periferních buněk – celý objem plasmy několikrát projde separátorem během izolace PBPC a obsahuje vysoké koncentrace mononukleárů a destiček; při odběru BMMNC dochází k pouhé centrifugaci a koncentraci kostní krve.

Nepozorovali jsme žádné závažné nežádoucí účinky po léčbě BMMNC nebo PBPC, nejčastějším nežádoucím účinkem byl otok končetiny po aplikaci buněčné suspenze, který se zlepšil po 2 týdnech bandáží a antiagregační terapii.

Naše studie prokázala srovnatelný klinický účinek léčby BMMNC i PBPC u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a SDN po neúspěšné standardní revaskularizaci oproti konzervativní léčbě, rovněž nebyl prokázán rozdíl v počtu prekursorových buněk získaných oběma metodami.

4.2.2 Studie 4: Posouzení lokální a systémové vaskulogeneze po aplikaci kmenových buněk u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a diabetem (Přílohy 10-13)

Efekt angiogenních cytokinů při intramuskulární aplikaci autologních KB je pravděpodobně parakrinní, ale přesná role sérových hladin těchto cytokinů při hodnocení klinického efektu a systémové vaskulogeneze zůstává stále nejasná. Vyplavení pro-angiogenních cytokinů jako VEGF, b-FGF, Ang-1, PDGF-AA a PDGF-BB a případný kompenzatorní vzestup inhibitoru angiogeneze endostatinu může reflekovat lokální a i potenciální systémovou vaskulogenezi.

Cílem naší práce bylo zhodnotit vztah sérových hladin pro- a anti-angiogenních cytokinů k lokální vaskulogenezi a množství aplikovaných KB a jejich vztah k riziku systémové vaskulogeneze.

Hypotéza: Sérové hladiny pro- a anti-angiogenních cytokinů mají vztah k terapeutické vaskulogenezi a mohou být ukazatelem případných systémových nežádoucích účinků.

Charakteristika souboru

Do studie bylo zařazeno 25 pacientů kritickou končetinovou ischemií (definovanou jako TcPO₂ < 30 mm Hg) a SDN (průměrný věk 61,9 ± 9,9; průměrný glykovaný hemoglobin 5,9 ± 1,3; trvání diabetu 21,5 ± 10,6) a s nemožností provedení standardní revaskularizace léčených v podiatrické ambulanci IKEM od ledna 2008 do června 2012. 14 pacientů bylo

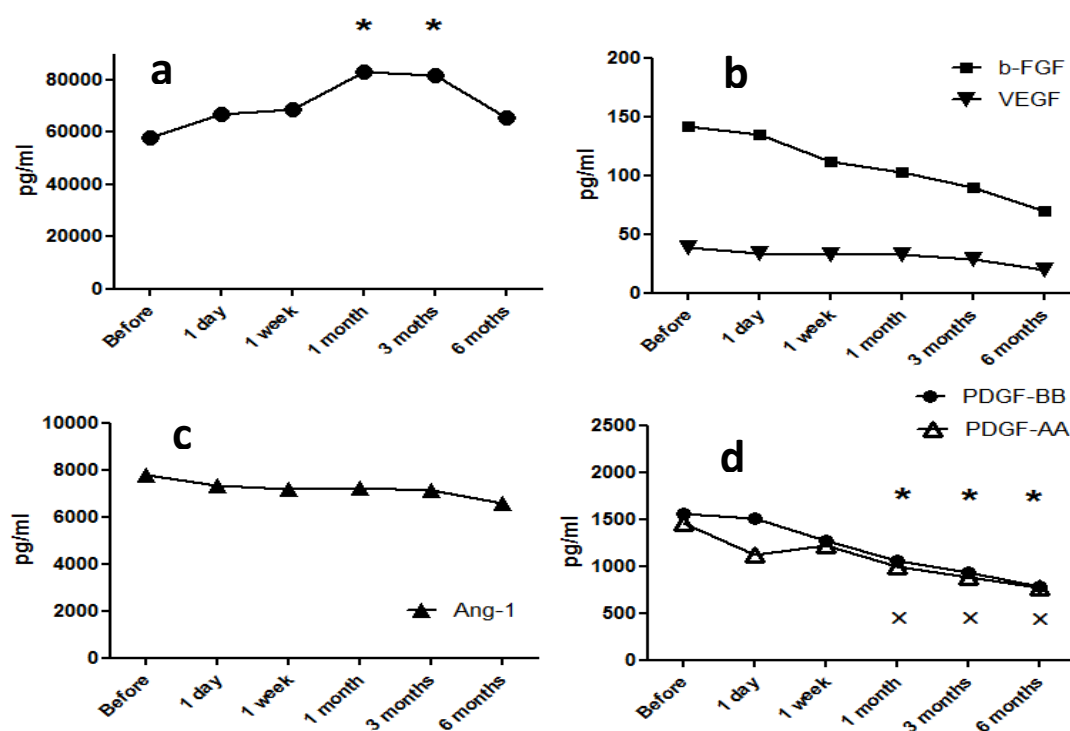
léčeno BMMNC získanými trepanobiopsií lopaty kosti kyčelní, 11 pacientů bylo léčeno PBPC získanými z periferní krve po předchozí stimulaci G-CSF (viz Vybrané metodiky). Získaná buněčná suspenze pak byla filtrována, centrifugována a následně aplikována do svalů postižené dolní končetiny.

Schéma studie

Sérové hladiny pro-angiogenních cytokinů (VEGF, b-FGF, Ang-1, PDGF-AA a PDGF-BB) a anti-angiogenního cytokinu (endostatin) byly hodnoceny v intervalech: před léčbou a za 1 den, 1 týden a dále 1, 3 a 6 měsíců po léčbě KB; vyšetření cév na očním pozadí jako ukazatel systémové vaskulogeneze bylo provedeno oftalmologem před a 6 měsíců po léčbě. Hladiny všech angiogenních cytokinů byly stanoveny metodou Luminex. Počet aplikovaných CD34+ prekursorových buněk byl hodnocen průtokovou cytometrií pomocí FACS. Lokální vaskulogeneze byla hodnocena pomocí TcPO₂ před a 6 měsíců po terapii KB.

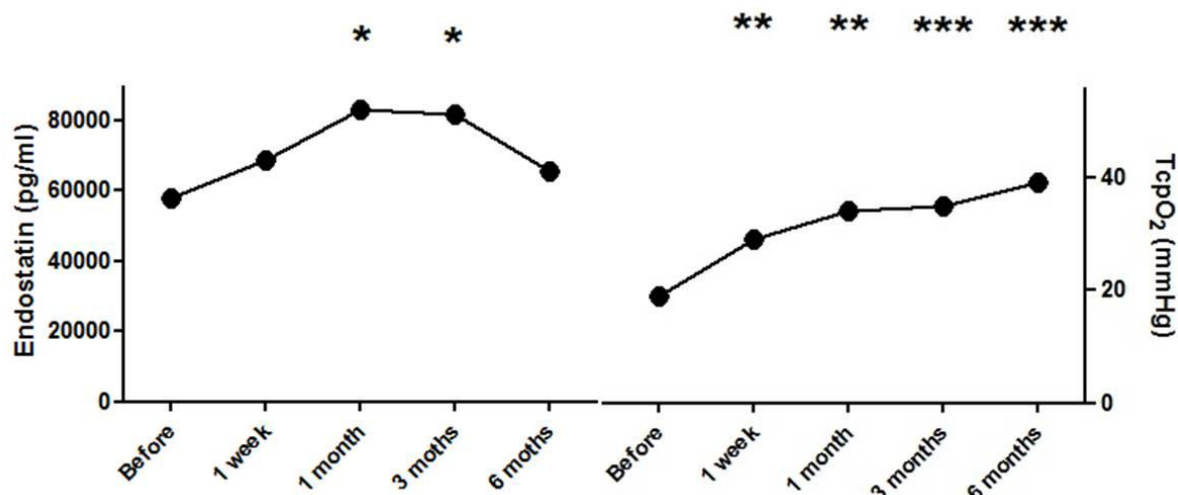
Výsledky studie

Sérové hladiny endogenního inhibitoru angiogeneze endostatinu signifikantně vzrostly po 1 a 3 měsících od terapie KB ($p = 0,0003$, Obrázek 13a); signifikantní vzestup hladin pro-angiogenních cytokinů jsme nepozorovali (Obrázek 13b,c) – hladiny PDGF-AA a PDGF-BB se signifikantně snížily po 1, 3 a 6 měsících ($p = 0,034$ and $p = 0,023$; Obrázek 13d). Medián celkového počtu aplikovaných buněk byl $1,4 (0,81 - 2,36) \times 10^7$. Byla pozorována signifikantní korelace mezi počtem aplikovaných CD34 buněk a hladinou endostatinu ($r = 0,41$; $p < 0,05$), korelace s hladinami pro-angiogenních cytokinů prokázána nebyla.



Obr 13. Vývoj sérových hladin angiogenních cytokinů po terapii KB ve vztahu k vstupním hladinám: 1a. Hladiny endostatinu; 1b. Hladiny VEGF a b-FGF; 1c. Hladiny Ang-1; 1d. Hladiny destičkových růstových faktorů (PDGF-AA a PDGF-BB). (Dubský et al. Diabetes Metab Res Rev, 2013)

Dále jsme nezaznamenali žádnou korelaci mezi klinickým efektem terapie KB a sérovými hladinami pro- nebo anti-angiogenních cytokinů. Klinický efekt měřený TcPO₂ byl signifikantně zlepšen z 19 (6 – 24,5) na 39 (35,25 – 48,5 mmHg ($p < 0,001$) po 6 měsících (Obrázek 14). Nepozorovali jsme také žádné změny na očním pozadí 6 měsíců od léčby KB.



Obr 14. Dynamika hladin Endostatinu a změn TcPO₂ do 6 měsíců ve srovnání s hodnotami před terapií KB. (Dubský et al. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013)

Diskuse ke studii

Nepozorovali jsme žádné známky rizika systémové vaskulogeneze – po terapii KB nedošlo ke zvýšení hladin pro-angiogenních cytokinů ani nebyly zjištěny proliferativní cévní změny na retině. Rovněž jsme nezjistili signifikantní korelace mezi sérovými hladinami angiogenních cytokinů a TcPO₂, což svědčí pro parakrinní efekt KB.

Hladiny inhibitoru angiogeneze endostatinu signifikantně stouply po 1 a 3 měsících. Jedno z možných vysvětlení vzestupu endostatinu po terapii KB je potenciální nepřímá známka zvýšené lokální vaskulogeneze díky negativní zpětné vazbě. Tuto teorii podporuje i nález signifikantní korelace mezi počtem aplikovaných CD34+ prekursorových buněk a hladinou endostatinu. Nepřítomnost korelace mezi hladinami endostatinu a klinickým efektem měřeným změnami TcPO₂ se dá vysvětlit odlišnou kinetikou obou parametrů (Obrázek 14). Endostatin jakožto c-terminální fragment kolagenu XVIII inhibuje VEGF-dependentní migraci endotelových prekursorových buněk a svými receptory blokuje adhezi buněk k extracelulární matrix [78]. Podle některých studií endostatin interferuje s endoteliální NO syntasou a antagonizuje její signální cestu [79]. Jeho mechanismus účinku ještě není plně prozkoumán, ale zřejmě působí i přes další signální cesty jako např. ovlivnění VEGF-indukované syntézy prostacyklinů.

Hladiny angiogenních cytokinů po terapii KB byly sledovány ve studiích jen ojediněle; Kajiguchi ve své studii ukázal, že intramuskulárně aplikované BMMNC sekretují angiogenní cytokiny jako jsou VEGF, b-FGF a Ang-1 v místě vpichu, které mohou pomoci mobilizaci progenitorových buněk do ischemické tkáně [80], hladiny angiogenních cytokinů byly vyšší u responderů (u pacientů klinicky zlepšených) oproti non-responderům a nelišily se 2 týdny po terapii ve srovnání s hodnotami před terapií.

Sérové hladiny angiogenních cytokinů mohou být ovlivněny nejen aplikací KB, ale i dalšími faktory jako např. zánětem, hojením ran nebo chirurgickými zákroky. Pacienti v naší

studii měli chronický defekt v různých stádiích hojení, což může ovlivnit sérové hladiny těchto cytokinů a vysvětlit variabilitu dynamiky jejich hladin.

Naše studie neprokázala žádný vztah mezi sérovými hladinami angiogenních cytokinů a klinickým efektem buněčné terapie kritické končetinové ischemie.

4.2.3 Studie 5: Zobrazení vaskulogeneze po aplikaci kmenových buněk u syndromu diabetické nohy pomocí perfuzní scintigrafie (Příloha 14)

Použití zobrazovacích metod u pacientů s ischemií dolních končetin a diabetem je vzhledem k charakteru postižení tepen často problematické. Pro hodnocení neoangiogeneze na úrovni malých kolaterál není vhodná kontrastní angiografie. Scintigrafie jakožto dynamická metoda hodnotící perfuzi dolní končetiny by mohla být alternativní zobrazovací metodou k hodnocení efektu léčby KB u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a nemožností další revaskularizace.

Cílem naší studie bylo posoudit možnosti scintigrafie lýtkových svalů pomocí ^{99}Tc MIBI při vizualizaci lokální vaskulogeneze po aplikaci KB.

Hypotéza: Scintigrafie pomocí ^{99}Tc MIBI je vhodnou zobrazovací metodou pro posouzení změn mikrocirkulace po léčbě autologními KB.

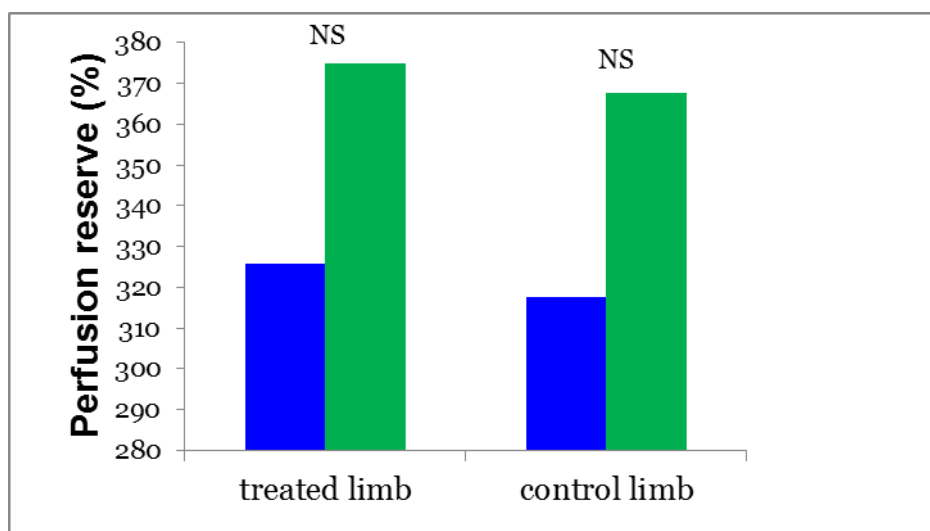
Charakteristika souboru a schéma studie

Do této pilotní studie bylo zařazeno 6 pacientů s kritickou končetinovou ischemií (průměrného věku $58 \pm 9,9$ let, průměrného trvání diabetu $23,2 \pm 7,3$ let, s průměrným vstupním TcPO_2 $6,5 \pm 5,4$ mm Hg), kteří nebyli po vysoké amputaci dolní končetiny a byli komplexně léčeni v naší podiatrické ambulanci.

Perfuzní scan lýtkových svalů byl proveden za použití radioizotopu ^{99m}Tc před a za 2 měsíce po terapii KB a byl korelován s hodnotami TcPO_2 jakožto ukazatelem tkáňové oxygenace při neinvazivním hodnocení mikrocirkulace. Z funkčních scintigrafických parametrů byla stanovena klidová četnost (rest count - RC), námahová četnost (exercising count - EC) a perfuzní rezerva (perfusion reserve - PR), která byla vypočítána podle vzorce $\text{PR} = (\text{EC} - \text{RC}) / \text{RC} \times 100 (\%)$.

Výsledky studie

Hodnoty TcPO_2 signifikantně vzrostly z $6,5 \pm 5,4$ mm Hg na $36,5 \pm 15,9$ mm Hg po 2 měsících od KB ($p = 0,03$). RC lýtkového svalu bylo bez významných změn, PR nesignifikantně vzrostla z $325,7 \pm 40,6$ % na $374,75 \pm 41,6$ % u léčené končetiny, podobný vzestup byl pozorován i u končetiny kontrolní (Obrázek 15). Nebyla zaznamenána žádná významná korelace mezi vzestupem TcPO_2 a změnami parametrů perfuzní scintigrafie ($r = 0,136$).



Obr 15. Perfuzní rezerva po 2 měsících od terapie KB u léčené a kontrolní končetiny

Diskuse ke studii

Nepozorovali jsme signifikantní změnu scintigrafických parametrů po aplikaci KB. Variabilita perfuzního scanu lýtkových svalů může být způsobena rozdílným clearancí pozadí a intervaly mezi fázemi a také metabolickými procesy, které ovlivňují mitochondriální příjem ^{99m}Tc -MIBI; hodnoty TcPO_2 mohou být ovlivněny otokem dolní končetiny, proto nebyla pozorována asociace mezi těmito parametry. Hodnota PR byla více asociována se vzestupem TcPO_2 než s RC, což naznačuje trend zlepšení spíše funkční rezervy lýtkového svalu než klidové perfuze po léčbě KB.

Perfuzní scan ^{99m}Tc -MIBI je dnes běžně využíván v klinice k diagnostice ischemické choroby srdeční, kde jeho reproducibilita byla dokázána v mnoha studiích [81]. Zkušenosti s jeho použitím v diagnostice ICHDK jsou však velmi omezené. Sayman používal scintigrafické metody k evaluaci perfuze na dolních končetinách u pacientů s klaudikacemi a u zdravých kontrol [82]. V kontrolní skupině lidí bez ICHDK byla pozorována symetrická perfuze obou DK oproti skupině s jednostrannou ICHDK, kde došlo k mírnému poklesu perfuzních četností u ischemické končetiny; autor vidí metodu jako přínosnou v diagnostice ICHDK u pacientů s relativní kontraindikací ke kontrastní nebo MR angiografii.

Naše studie neprokázala významný vzestup scintigrafických parametrů perfuze na cévách dolních končetin po léčbě KB.

4.2.4 Studie 6: Porovnání efektu aplikace kmenových buněk se standardní revaskularizací pomocí perkutánní transluminální angioplastiky u pacientů se syndromem diabetické nohy (Přílohy 15-19)

Terapie SDN autologními KB je indikována u pacientů s přetrvávající ischemií po standardní revaskularizaci (Příloha 19), srovnání efektu této léčebné metody s PTA však dosud chybí.

Cílem naší studie bylo porovnat účinnost terapeutické vaskulogeneze KB se standardní metodou revaskularizace (PTA).

Hypotéza: Terapeutická vaskulogeneze pomocí KB z kostní dřeně i z periferní krve je alespoň srovnatelná se standardní metodou revaskularizace pomocí PTA u pacientů se SDN.

Charakteristika souboru a schéma studie

Do studie byli zařazeni pacienti léčení v podiatrické ambulanci od 1/2008 do 12/2009 pomocí KB po neúspěšné standardní revaskularizaci (KB skupina, n=15); aktivním komparátorem byli pacienti léčení ve stejném období standardní revaskularizací – PTA – (PTA skupina, n=21; Tabulka 4). Všichni pacienti měli před výkonem kritickou končetinovou ischemii definovanou hodnotou transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂) < 30 mm Hg. 14/15 (93.3%) pacientů v KB skupině a 19/21 (90.5%) pacientů v PTA skupině mělo chronický defekt velikosti 0,5 až 7 cm², stupně 1C-3C podle Texaské klasifikace a bez známek akutní infekce.

Postup izolace a aplikace KB byl stejný jako v předchozích studiích. Pacienti v KB skupině se signifikantně nelišili od pacientů v PTA skupině v základních demografických charakteristikách ani ve vstupních hodnotách TcPO₂. Dále byly hodnoceny nálezy na digitální subtrakční angiografii před terapií KB nebo PTA pomocí mezinárodních klasifikací Graziani [83] a Transatlantického mezioborového konsensu (TASC II) [70].

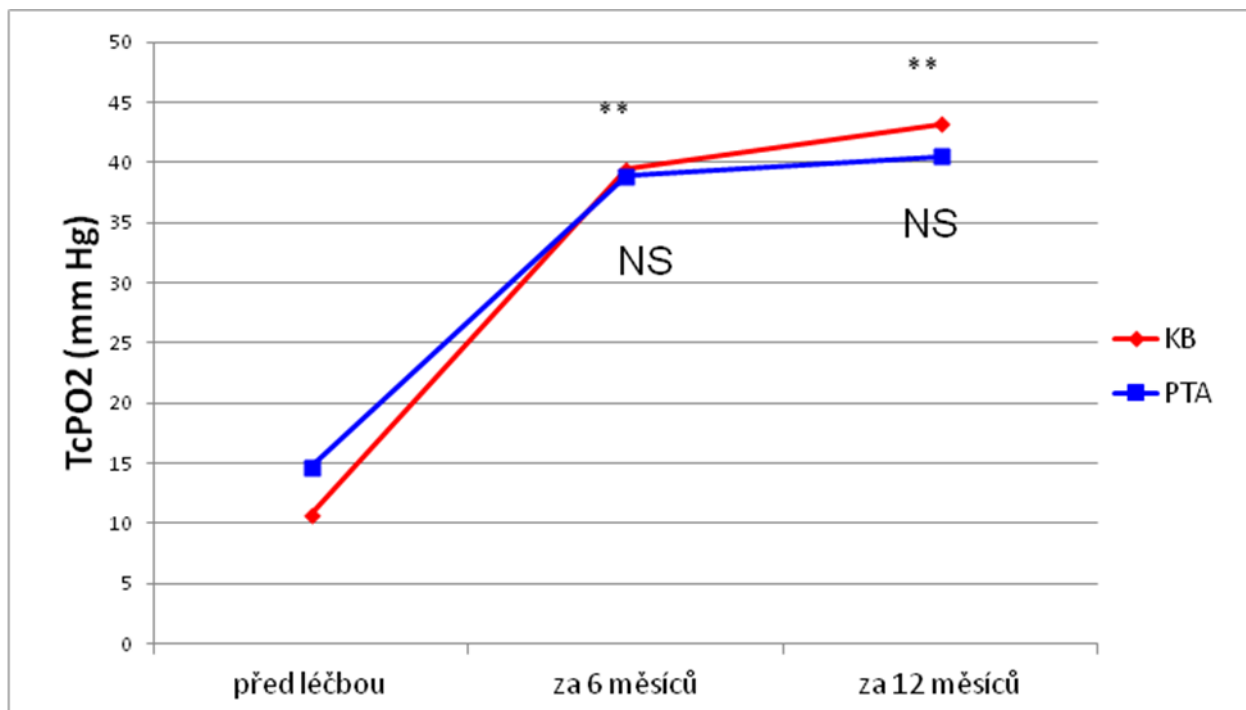
Terapeutická metoda	KB	PTA	p
Počet pacientů	n = 15	n = 21	
Věk (roky)	63 ± 7,8	63 ± 11	NS
Pohlaví (% mužů)	80	75,6	NS
Trvání diabetu (roky)	24 ± 10	20 ± 7,3	NS
Glykovaný hemoglobin (%)	6 ± 0,9	6,3 ± 1,6	NS
TcPO ₂ před léčbou (mm Hg)	10,7 ± 8,5	14,7 ± 8,1	NS
Plocha defektu před léčbou (cm ²)	3,6 ± 2,9	3,2 ± 2,0	NS
Komorbidity:			
Diabetická neuropatie (%)	100	94,9	NS
ICHS (%)	66,7	52,4	NS
Renální selhání řešené dialýzou (%)	6,7	4,8	NS
Transplantace nebo imunosuprese (%)	6,7	9,5	NS

Tab 4. Charakteristiky pacientů ve skupině léčené kmenovými buňkami a PTA

Výsledky studie

Hodnoty TcPO₂ signifikantně vzrostly oproti bazálním hodnotám ve skupině KB i ve skupině PTA po 6 měsících (28,1 ± 12,6 vs. 24,9 ± 11 mm Hg; p < 0.001) i po 12 měsících (28,9 ± 8,1; p < 0.01 vs. 28,5 ± 12,5 mm Hg; p < 0.001) bez signifikantního rozdílu mezi oběma metodami léčby (Obrázek 16). Počet zhojených pacientů ve skupině KB i ve skupině PTA se signifikantně nelišil po 6 ani 12 měsících (50 vs. 36,8 %; p = 0,5 a 64,3 vs. 36,8 %; p = 0,16), počet zhojených pacientů ve 3 měsících byl ale signifikantně vyšší ve skupině KB (46,7 vs 19 %, p = 0,04). Pacienti léčení pomocí KB měli podstatně závažnější angiografické nálezy před

terapií - stupeň postižení bérceových tepen Graziani 3 a více (okluze 1-3 bérceových tepen a mnohočetné stenózy na bérce a stehně) byl pozorován u 90,9 % pacientů; postižení stupně D dle TASC II (okluze podkolenní tepny delší než 2 cm a mnohočetné kratší okluze a stenózy) bylo přítomno u 59,1 % pacientů. Pacienti léčení PTA měli méně závažné angiografické nálezy - 76,9 % pacientů Graziani 3 a více ($p < 0,05$), TASC II D u 50 % pacientů (NS).



** $p < 0,01$ změny oproti hodnotě před terapií

NS rozdíly mezi vzestupy po KB a PTA

Obr 16. Změny $TcPO_2$ za 6 a 12 měsíců po léčbě KB a PTA

Diskuse ke studii

Naše studie prokázala srovnatelný dlouhodobý efekt aplikace autologních KB do lýtkových svalů na terapii ischemie se standardní metodou revaskularizace pomocí PTA.

Pozorovali jsme signifikantně rychlejší hojení 3 měsíce po terapii KB proti PTA, počet zhojených pacientů po 6 měsících a po 12 měsících byl již bez signifikantního rozdílu. Obě skupiny pacientů byly léčeny komplexně v naší podiatrické ambulanci pomocí odlehčení terapeutickou obuví nebo sádkou a v indikovaných případech byla nasazena antibiotika. Tento rozdíl v rychlosti hojení krátce po aplikaci KB může být vysvětlen parakrinním efektem aplikovaných buněk a arteriogenezí na lokální úrovni, aplikace buněk do okolí defektu a do jeho spodiny může vést k akceleraci lokální vaskulogeneze. Tyto výsledky se shodují s metaanalýzou publikovanou Fadinim, kdy terapie autologním KB signifikantně zlepšila hojení ran oproti kontrolní skupině (OR 3,54; 95% C.I. 1,09 – 11,51; $p = 0,032$) [36].

Možným dalším krokem v léčbě autologními KB je léčba pacientů se středně závažnou ICHDK, zatím byla tato léčba indikována pouze u pacientů s kritickou končetinovou ischemií bez možnosti jiné revaskularizace. Tito pacienti však mají velmi vysoké riziko kardiovaskulárních komplikací a všechny rizikové faktory musí být sledovány a ošetřeny pro zlepšení přežívání těchto polymorbidních pacientů [84, 85].

Výsledky naší studie terapie kritické končetinové ischemie ukazují, že autologní KB mohou zlepšit ischemii končetin u pacientů se SDN srovnatelně jako PTA i při závažnějším angiografickém nálezů před terapií.

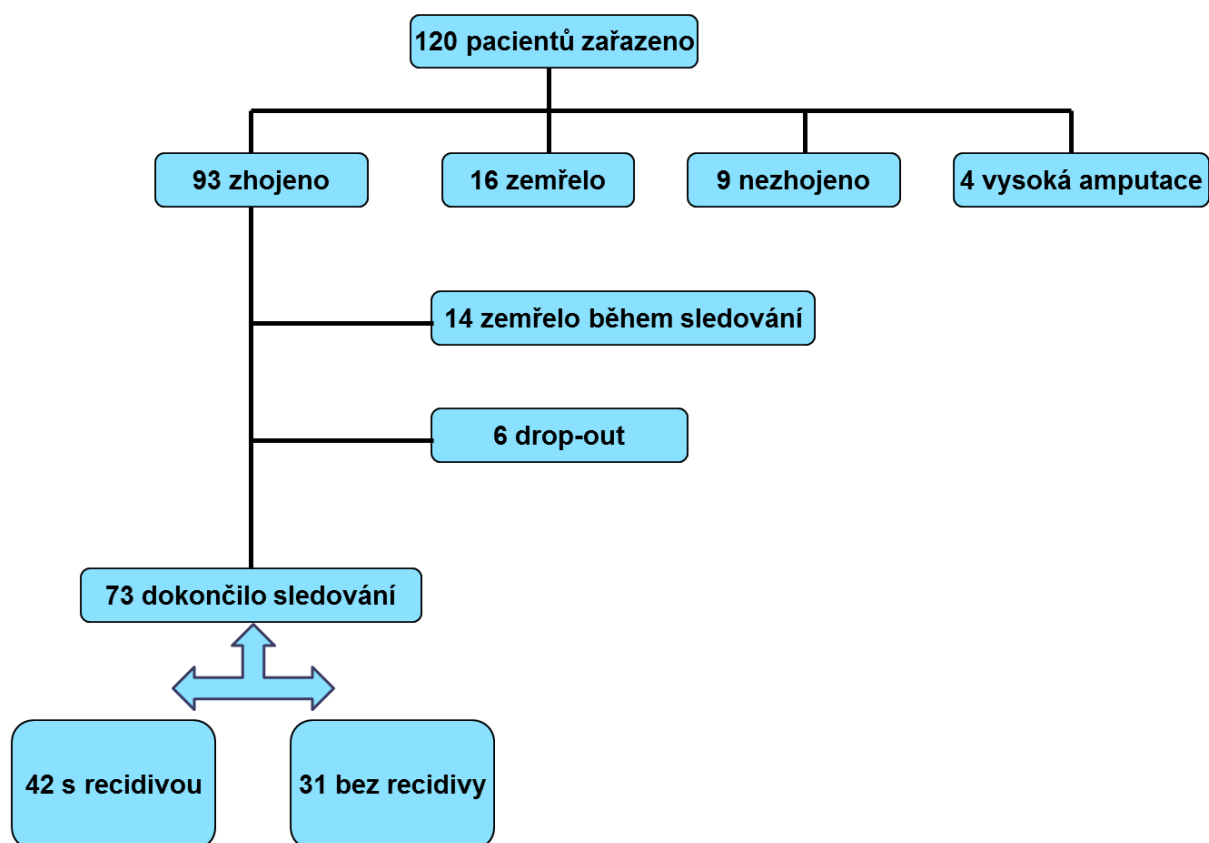
4.3 Infekce u syndromu diabetické nohy

4.3.1 Studie 7: Posouzení rizikových faktorů recidivy syndromu diabetické nohy s přihlédnutím k osteomyelitidě (Přílohy 20-22)

Rekurentní ulcerace u SDN jsou často dlouhodobé a zhoršují jak kvalitu života pacientů, tak i jejich compliance k adekvátní léčbě [86]. U těchto pacientů jsou také extrémně zvýšené náklady na léčbu SDN, zejména pokud vyžadují odborné domácí ošetřování nebo dospějí k vyšší amputaci [87]. Pacient se zhojeným SDN je ve velkém riziku jeho reulcerace, a proto by měl být dle doporučení Mezinárodního konsensu pro syndrom diabetické nohy sledován na specializované podiatrické ambulanci každé 1-3 měsíce [1]. Faktory ovlivňující neúspěšné hojení syndromu diabetické nohy mohou být odlišné od faktorů ovlivňujících jeho recidivu.

Cílem této práce bylo zhodnotit výskyt a rizikové faktory reulcerací se zaměřením na osteomyelitidu během 3-letého sledování po zhojení syndromu diabetické nohy

Hypotéza: Osteomyelitida je významným patogenetickým faktorem pro rekurenci SDN.



Obr 17. Schéma původní studie Eurodiale a našeho následného 3-letého sledování. (Dubský et al. Int Wound J, 2012)

Charakteristika souboru a schéma studie

Do studie byli zařazeni pacienti se zhojeným SDN, kteří byli sledováni v našem centru v rámci mezinárodní multicentrické studie Eurodiale. Z 93 zhojených pacientů během následného 3-letého sledování 14 zemřelo a ze 79 žijících pacientů bylo 73 zařazeno do této studie (6 osob dále nespolupracovalo; Obrázek 17).

Metodika a zhodnocení výsledků

Rizikové faktory recidivy byly rozděleny na faktory demografické (věk, pohlaví, vzdálenost do zdravotnického zařízení), faktory vztahující se k diabetu (trvání diabetu a jeho terapie, špatná kompenzace definovaná glykovaným hemoglobinem ($HbA_{1c} > 60$ mmol/mol), komorbidita (nadváha a obezita definovaná $BMI > 27$, konečné stadium renální insuficience, aktivní kouření, chronické užívání alkoholu) a faktory vztahující se k syndromu diabetické nohy (ischemie končetiny, osteomyelitida, klinické známky infekce, CHOA, velikost, lokalizace a hloubka defektu, elevace $CRP \geq 5$ mg/l a předchozí amputace).

Výsledky studie

Recidiva defektu byla během 3-letého sledování pozorována u 42/73 (57,5 %) pacientů. Postupná regresní analýza všech rizikových faktorů prokázala, že plantární lokalizace defektu (OR 8,62; 95 % CI 2,2 – 33,2), přítomnost osteomyelitidy (OR 5,17; 95 % CI 1,4 – 18,7), hodnota $HbA_{1c} > 60$ mmol/mol (OR 4,07; 95 % CI 1,1 – 15,6) a hladina $CRP \geq 5$ mg/l (OR 4,27; 95 % CI 1,2 – 15,7) byly nezávislými rizikovými faktory pro vznik recidivy SDN, ostatní hodnocené faktory nebyly signifikantní (Tabulka 5).

<i>Faktory</i>	<i>Koeficient (ln OR)</i>	<i>OR</i>	<i>95 % CI</i>
Plantární lokalizace defektu	2.15	8.62	2.2 – 33.2
Osteomyelitida	1.64	5.17	1.4 – 18.7
$HbA_{1c} > 60$ (mmol/mol)	1.4	4.07	1.1 – 15.6
$CRP \geq 5$ (mg/l)	1.45	4.27	1.2 – 15.7

Tab 5. Faktory z multivariační postupné regresní analýzy signifikantně ovlivňující recidivu SDN

Diskuse ke studii

Naše výsledky výskytu reulcerací jsou podobné prospektivní kohortě publikované Petersem, který zjistil 60,5 % reulcerací u 81 pacientů sledovaných 31 měsíců [50]. Také ve studii publikované Apelqvistem, kde bylo hodnoceno 468 pacientů zhojených primárně po nízké nebo vyšší amputaci, byla pozorována rekurence 61 % po 3 letech [51]. Ghanassia et al pozoroval podobné procento reulcerací (60, 9 %) u 89 pacientů během dlouhého průměrného sledování 79 měsíců [88].

Nejsilnější asociaci jsme pozorovali mezi rekurencí defektů a jejich plantární lokalizací. Defekty v této oblasti jsou vystaveny vysokému plantárnímu tlaku a dochází tak k jejich ischemizaci [89]. Potvrdili jsme, že osteomyelitida je velice významným rizikovým faktorem pro reulcerace [90, 91], Tento nález může souviset s obtížnou léčbou chronické

osteomyelitidy, která může přetrvávat i přes antibiotickou léčbu. Kowalski [92] zjistil, že residuální osteomyelitida na okrajích kosti po chirurgické resekci je asociována s vyšším procentem selhání léčby - proximálnější amputace byla nutná u 43 % pacientů s tímto nálezem oproti 15 % pacientů bez reziduální osteomyelitidy ($p = 0,001$).

Dalším faktorem ovlivňujícím recidivu SDN v naší studii byla elevace CRP, což opět svědčí pro významnou roli infekce v patogenezi ulcerací. Jeandrot potvrdil, že elevace CRP je přínosná pro diagnostiku infekce u pacientů se SDN [91]. Lipsky pozoroval asociaci mezi zvýšením CRP a selháním léčby infikovaných ulcerací v prospektivní studii [93].

Špatná kompenzace diabetu, definovaná jako $HbA_{1c} > 60$ mmol/mol, byla v naší studii dalším významným rizikovým faktorem pro reulceraci. Obdobně ve studii Manteyho byly hodnoty HbA_{1c} signifikantně vyšší u pacientů s recidivou SDN oproti skupině bez recidivy [94]. Connor pozoroval vztah mezi HbA_{1c} a vyšším rizikem vzniku ulcerace během 10 let u pacientů po předchozích zhojených neuropatických defektech [95].

Výsledky naší studie prokázaly vyšší riziko recidivy SDN u pacientů s plantární lokalizací defektů, s osteomyelitidou a s vyšším CRP. Významnou roli hrála i špatná kompenzace diabetu, která může svědčit pro non-compliance i s jinými doporučeními v terapii SDN.

4.4 Kostní metabolismus u Charcotovy osteoarthropatie

4.4.1 Studie 8: Role kvantitativních parametrů dynamické scintigrafie v hodnocení kostního obratu u pacientů s Charcotovou nohou (Příloha 23)

Časná morfologická diagnostika CHOA a monitorování aktivity onemocnění hraje důležitou roli při péči o pacienty s tímto onemocněním [96]. Běžně se morfologie CHOA diagnostikuje pomocí rentgenového vyšetření, CT nebo MR a měření kožní teploty je používáno k monitoraci případné progresy onemocnění [97], tyto metody však nejsou schopny zhodnotit proces kostní remodelace a zejména u pacientů s bilaterálním postižením CHOA jsou mnohdy značně nepřesné [98].

Cílem naší studie bylo definovat kvantitativní scintigrafické parametry vhodné k hodnocení aktivity CHOA na podkladě jejich změn v průběhu léčby a na podkladě korelací s parametry kostní remodelace.

Hypotéza: Dynamická scintigrafie kostí je vhodnou metodou pro posouzení aktivity CHOA a souvisí s parametry kostní remodelace.

Charakteristika souboru

Do studie bylo zařazeno 42 pacientů s unilaterální CHOA diagnostikovanou pomocí dynamické scintigrafie skeletu, kteří byli léčeni v naší podiatrické ambulanci během 3 let. 21 pacientů s neaktivní formou CHOA bylo vyšetřeno průřezově, zbývajících 21 pacientů s aktivní formou bylo intenzivně sledováno a kostní scintigrafie byla opakována po léčbě v neaktivní fázi.

Schéma studie

Dynamická kostní scintigrafie byla provedena po intravenózní aplikaci 740 MBq ^{99m}Tc -methylenedifosfonátu. Pro kvantitativní hodnocení aktivity CHOA jsme definovali tyto parametry dynamické scintigrafie skeletu: FWB (Foot/Whole Body ratio) – relativní akumulace radiofarmaka v oblasti nohy (poměr počtu detekovaných impulzů v oblasti nohy

ku oblasti celého těla) a BFV (Blood Flow Velocity) – rychlost krevního průtoku končetinou (vypočtená jako poměr mezi vzdáleností bifurkací aorty a kotníkem a rozdílu času začátků krevního průtoku radiofarmaka v oblasti kotníku a bifurkace). Tyto parametry byly porovnány s ukazateli kostního obratu: COOH-terminální telopeptid kolagenu typu I (1CTP) a kostně specifická izoforma alkalické fosfatázy (BALP).

Výsledky studie

Pacienti s aktivním a neaktivním CHOA se nelišili v základních demografických charakteristikách (věk, pohlaví, trvání diabetu, kompenzace diabetu). Pacienti s aktivním CHOA měli signifikantně vyšší parametry aktivity onemocnění (Tabulka 6). Byla pozorována signifikantní korelace mezi FWB i BFV a markery kostního obratu (1CTP a BALP – $p < 0,0001$ a $p < 0,0004$ resp.), pouze u pacientů s aktivní CHOA byla pozorována korelace mezi měřením kožní teploty a FWB a BFV ($p < 0,01$). Také jsme pozorovali signifikantní snížení scintigrafických parametrů po léčbě pacientů s aktivní CHOA. Dále byla zjištěna signifikantní korelace mezi změnami FWB a 1CTP ($p < 0,002$), BALP ($p < 0,005$) a změnou kožní teploty ($p < 0,02$) u pacientů s aktivním CHOA v následném sledování v porovnání se vstupními hodnotami.

	<i>Neaktivní CHOA</i>	<i>Aktivní CHOA</i>	<i>Následní sledování*</i>
n	21	21	21
Věk (roky)	52,33 ± 10,63	54,29 ± 9,64	-
Pohlaví (M/Ž)	12/9	13/8	-
Trvání diabetu (roky)	17,10 ± 7,52	19,81 ± 10,06	-
Diabetes 2. typu	14 (66,7 %)	14 (66,7 %)	-
Biothesiometr (V)	43,67 ± 7,73	44,48 ± 8,17	-
HbA _{1c} (DCCT)	8,58 ± 1,99	8,36 ± 1,55	8,21 ± 1,57
1CTP	6,95 ± 2,32	9,57 ± 4,16	7,61 ± 3,55
BALP	11,22 ± 2,66	15,23 ± 7,90	10,82 ± 6,71
Rozdíl kožní teploty (°C)	1,17 ± 0,46	3,15 ± 1,22	1,09 ± 0,48
BFV (m/s)	9,33 ± 3,10	11,54 ± 3,70	8,11 ± 2,51
FWB	3,30 ± 1,44	5,20 ± 2,86	2,67 ± 1,12

Tab 6. Demografické, biochemické a radiologické parametry při vstupu do studie a po následném sledování u pacientů s aktivní a neaktivní CHOA

** průměrná doba sledování pacientů s aktivním CHOA byla 24,6 ± 6,8 měsíce*

Diskuse ke studii

Výsledky naší studie potvrdily, že nové kvantitativní scintigrafické parametry FWB a BFV signifikantně korelují s markery kostního obratu u pacientů s CHOA. Podobně McGill prokázala korelaci mezi aktivitou CHOA měřenou změnou kožní teploty a akumulací radiofarmaka v postižené i nepostižené končetině, ale na rozdíl od naší studie její scintigrafické parametry posuzující hodnoty unilaterálně se změnou kožních teplot nekorelovaly [99]. Námi definovaný parametr FWB je nezávislý na krevním průtoku ipsilaterální končetinou, na rozdíl od parametru BFV, který je závislý na vaskulární reaktivitě a tudíž může být ovlivněn dalšími faktory (např. infekcí nohy). Změna kožní teploty dobře korelovala s oběma scintigrafickými parametry při vstupu do studie i po následném sledování, což potvrzuje důležitost měření kožních teplot k posouzení aktivity onemocnění.

5 Závěry a shrnutí dizertační práce

Výsledky jednotlivých studií této dizertační práce shrneme do následujících kapitol:

Patologické procesy v oblasti hojení ran a akcelerace hojení pomocí nových materiálů

1. Naše experimentální studie ukázala, že existují rozdíly mezi různými typy nanovláken v efektu na hojení ran. Želatinová nanovláknina produkovaná bezjehlovou technologií elektrospinningu byla vhodným nosičem lidských buněk a potenciálně novým lokálním prostředkem urychlujícím hojení ran. U dalšího nanovláknenného materiálu - poly- ϵ -caprolaktonu - byly prokázány pouze jeho uspokojivé vlastnosti jako nosiče buněk, efekt na hojení ran se ale nelišil od kontrolní skupiny léčené gázou.
2. Výsledky naší klinické studie ukázaly, že acellulární porcinní dermis je ve vhodné indikaci účinnou metodou lokální léčby syndromu diabetické nohy a má určité výhody ve srovnání s kožními xenotransplantáty.

Terapeutická vaskulogeneze ischemické choroby dolních končetin a syndromu diabetické nohy

1. V oblasti terapeutické vaskulogeneze jsme prokázali srovnatelný efekt kmenových buněk získávaných dvěma různými metodami – izolací jak z kostní dřeně, tak z periferní krve po stimulaci filgrastimem. U obou těchto metod došlo ke srovnatelnému zlepšení parametrů ischemie u diabetiků s kritickou končetinovou ischemií ve srovnání s konzervativní léčbou.
2. Při posouzení rizika systémových účinků terapeutické vaskulogeneze jsme neprokázali signifikantní vzestup sérových hladin pro-angiogenních cytokinů, které by mohly zvyšovat riziko systémové vaskulogeneze. Naším originálním nálezem bylo zvýšení sérové hladiny inhibitoru angiogeneze endostatinu po aplikaci kmenových buněk - tento nález by mohl odrážet zpětnovazebnou regulaci angiogeneze a být ukazatelem průběhu lokální vaskulogeneze.
3. Naše další studie neprokázala jednoznačný přínos perfuzního scanu lýtkových svalů pomocí ^{99m}Tc MIBI po léčbě kmenovými buňkami pro posouzení jejich efektivity.
4. Originálním nálezem bylo zjištění obdobného efektu terapeutické vaskulogeneze po aplikaci kmenových buněk se standardní revaskularizací pomocí perkutánní transluminální angioplastiky. Vzestup transkutánní tenze kyslíku po 1 roce od léčby byl srovnatelný, přestože pacienti léčení kmenovými buňkami měli závažnější angiografický nález (bez možnosti standardní revaskularizace).

Vliv infekce na recidivu ulcerací u syndromu diabetické nohy

Prokázali jsme význam infekce (chronické osteomyelitidy a elevace CRP) a plantární lokalizace defektů pro riziko recidivy ulcerací u pacientů se zhojenými defekty. Významnou roli hrála i špatná kompenzace diabetu (vyšší glykovaný hemoglobin), která může svědčit nejen pro patogenetický účinek hyperglykémie, ale může odrážet i obecně špatnou spolupráci pacientů.

Patologické procesy v oblasti kostního metabolismu a Charcotovy osteoarthropatie

Definovali jsme nové kvantitativní scintigrafické parametry vhodné pro posouzení aktivity Charcotovy osteoarthropatie. Sledování těchto parametrů může napomoci racionalizaci terapie Charcotovy osteoarthropatie, zejména nutnosti odlehčení.

Do budoucna se chceme věnovat zejména dalšímu rozvoji buněčné terapie SDN, včetně její indikace u lehčích stupňů ischemie dolních končetin jako alternativu ke standardní revaskularizaci a případně i kombinaci obou metod. Vývoj nových lokálních prostředků k hojení ran na principu buněčné léčby je dalším okruhem našeho budoucího výzkumu. Nové materiály jako nanovlákná nebo acellulární porcinní dermis mohou sloužit jako buněčné nosiče a mohou významně urychlit hojení chronických ran v rámci SDN.

6 Poděkování

Na prvním místě musím poděkovat mé školitelce prof. MUDr. Alexandře Jirkovské, CSc., která velmi profesionálně a zároveň lidsky dohlížela na můj vědecký i klinický rozvoj. Jsem rád, že moje postgraduální studium probíhalo pod jejím vedením na pracovišti, které je jak po vědecké, tak i po klinické stránce na úrovni předních evropských pracovišť.

Děkuji prof. MUDr. Terezii Pelikánové, DrSc. a prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc. za vytvoření kvalitního zázemí na Klinice diabetologie Centra diabetologie IKEM.

Dále bych rád poděkoval kolegům z výzkumného týmu MUDr. Robertu Bémovi, Ph.D., MUDr. Vladimíře Fejfarové, Ph.D. a MUDr. Veronice Woskové za velkou pomoc při často velmi náročné péči o pacienty v jednotlivých studiích.

Velký dík také patří kolektivu podiatrických sester – Monice Kučerové, Petře Vašíčkové, Ludmile Řezaninové, Lucii Wiedermannové, Martě Křížové, Aleně Stříbrské a edukační sestře Kateřině Čechové za neocenitelnou pomoc při organizaci a realizaci výzkumných programů.

V neposlední řadě bych také rád poděkoval svojí rodině - rodičům za pozitivní vedení ke studiu a mojí manželce a dvěma synům za podporu a pochopení často velmi náročné činnosti vědeckého pracovníka.

7 Seznam použitých zkratk

1CTP – karboxyterminální telopeptid kolagenu I
Ang-1 – Angiopoietin-1
b-FGF – basický fibroblastový růstový faktor
BFV – blood flow velocity
BMMNC – mononukleární buňky izolované z kostní dřeně
CLI – kritická končetinová ischemie
CRP – C-reaktivní protein
CT – počítačová tomografie
EPC – endotelové prekursorové buňky
FACS – fluorescence-activated cell sorting
FWB – foot and whole body ratio
G-CSF – granulocyty-kolonie stimulující faktor
HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin
CHOA – Charcotova osteoartróza
ICHDK – ischemická choroba dolních končetin
KB – kmenové buňky
MDP – methylen difosfonát
MIBI – methoxyisobutylisonitrilu
MR – magnetická rezonance
NO – oxid dusnatý
NS – není signifikance
PBPC – prekursorové buňky z periferní krve po stimulaci granulocyty-kolonie stimulujícím faktorem
PDGF-AA – destičkový růstový faktor AA
PDGF-BB – destičkový růstový faktor BB
IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny
PTA – perkutánní transluminální angioplastika
RANK – receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappa β
RANKL – ligand receptorového aktivátoru nukleárního faktoru kappa β
RTG – rentgenové vyšetření
SDN – syndrom diabetické nohy
SPECT – single photon emission computer tomography
Tc – technetium
TcPO₂ – transkutánní tenze kyslíku
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGF-R2 – receptor pro vaskulární endoteliální faktory typu 2

8 Seznam použité literatury

1. International Working Group on the Diabetic Foot. *International Consensus on the Diabetic Foot & Practical Guidelines on the Management and Prevention of the Diabetic Foot*. 2011.
2. Jirkovská, A., *Charcotova osteoartropatie*, in *Syndrom diabetické nohy*, A. Jirkovská, Editor. 2006, Maxdorf: Praha. p. p. .
3. Rušavý, Z., *Diabetická noha: diagnostika a terapie v praxi*. 1998, Praha: Galén.
4. Jirkovská, *Hojení ran a lokální terapie*, in *Syndrom diabetické nohy*, A. Jirkovská, Editor. 2006, Maxdorf: Praha. p. 249-267.
5. Jeffcoate, W.J., P. Price, and K.G. Harding, *Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2004. **20 Suppl 1**: p. S78-89.
6. Buchberger, B., et al., *The Evidence for the Use of Growth Factors and Active Skin Substitutes for the Treatment of Non-Infected Diabetic Foot Ulcers (DFU): A Health Technology Assessment (HTA)*. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association, 2011.
7. Guldmond, N.A., et al., *The effects of insole configurations on forefoot plantar pressure and walking convenience in diabetic patients with neuropathic feet*. Clinical biomechanics, 2007. **22**(1): p. 81-7.
8. Khang, D., et al., *Nanotechnology for regenerative medicine*. Biomed Microdevices, 2010. **12**(4): p. 575-87.
9. Kumbar, S.G., et al., *Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 2591-607.
10. Chandrasekaran, A.R., et al., *Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration*. Biomed Mater, 2011. **6**(1): p. 015001.
11. Sixta, B., Herdegen, P., Bém, R et al, *Zkušenosti s xenotransplantáty při hojení diabetické nohy*. Chirurgie HPB, 2003. **11**(1): p. 37-38.
12. Dini, V., et al., *Cutaneous tissue engineering and lower extremity wounds (part 2)*. Int J Low Extrem Wounds, 2006. **5**(1): p. 27-34.
13. Edmonds, M., *Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers*. Int J Low Extrem Wounds, 2009. **8**(1): p. 11-8.
14. Mahmoud, S.M., et al., *Split-skin graft in the management of diabetic foot ulcers*. J Wound Care, 2008. **17**(7): p. 303-6.
15. Moustafa, M., et al., *Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers*. Regen Med, 2007. **2**(6): p. 887-902.
16. Teng, Y.J., et al., *Bioengineered skin in diabetic foot ulcers*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12**(4): p. 307-15.
17. Zajicek, R., et al., *New biological temporary skin cover Xe-Derma((R)) in the treatment of superficial scald burns in children*. Burns. **37**(2): p. 333-7.
18. Matouskova, E., et al., *Prevention of burn wound conversion by allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis*. Cell Tissue Bank, 2002. **3**(1): p. 29-35.
19. Al Mheid, I. and A.A. Quyyumi, *Cell therapy in peripheral arterial disease*. Angiology, 2008. **59**(6): p. 705-16.
20. Attanasio, S. and J. Snell, *Therapeutic angiogenesis in the management of critical limb ischemia: current concepts and review*. Cardiol Rev, 2009. **17**(3): p. 115-20.
21. Wahlberg, E., *Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia*. J Vasc Surg, 2003. **38**(1): p. 198-203.
22. Jiang, M., et al., *In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1alpha-modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1alpha-modified EPC for angiogenesis)*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2284-95.
23. Lawall, H., P. Bramlage, and B. Amann, *Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal*. Thromb Haemost, 2010. **103**(4): p. 696-709.
24. Huang, P., et al., *Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2155-60.
25. Tateishi-Yuyama, E., et al., *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9331): p. 427-35.
26. Awad, O., et al., *Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 758-64.

27. Timmermans, F., et al., *Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(7): p. 1572-9.
28. Davidson, *New and Alternative Treatments for the Diabetic Foot: Stem Cells and Gene Transfer*. The Foot in Diabetes 4th Edition, 2006.
29. Fadini, G.P., C. Agostini, and A. Avogaro, *Characterization of endothelial progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **336**(1): p. 1-2.
30. Sivan-Loukianova, E., et al., *CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds*. *J Vasc Res*, 2003. **40**(4): p. 368-77.
31. Grote, K., et al., *The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 877-85.
32. Miller-Kasprzak, E. and P.P. Jagodzinski, *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007. **55**(4): p. 247-59.
33. Kajiguchi, M., et al., *Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia*. *Circ J*, 2007. **71**(2): p. 196-201.
34. Kawamura, A., et al., *Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs*. *J Artif Organs*, 2006. **9**(4): p. 226-33.
35. Klepanec, A., et al., *No Difference in Intraarterial and Intramuscular Delivery of Autologous Bone-Marrow Cells in Patients with Advanced Critical Limb Ischemia*. *Cell Transplant*, 2012.
36. Fadini, G.P., C. Agostini, and A. Avogaro, *Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature*. *Atherosclerosis*, 2010. **209**(1): p. 10-7.
37. Deindl, E., et al., *Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis*. *Circ Res*, 2003. **92**(5): p. 561-8.
38. Zachary, I. and G. Gliki, *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family*. *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 568-81.
39. Shichiri, M. and Y. Hirata, *Antiangiogenesis signals by endostatin*. *FASEB J*, 2001. **15**(6): p. 1044-53.
40. Song, N., et al., *The nuclear translocation of endostatin is mediated by its receptor nucleolin in endothelial cells*. *Angiogenesis*, 2012. **15**(4): p. 697-711.
41. Ruiz-Salmeron, R., et al., *Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia*. *Cell Transplant*. **20**(10): p. 1629-39.
42. Gropler, R.J., et al., *Imaging myocardial metabolic remodeling*. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2010. **51 Suppl 1**: p. 88S-101S.
43. Peregrin, J.H., et al., *PTA of infrapopliteal arteries: long-term clinical follow-up and analysis of factors influencing clinical outcome*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2010. **33**(4): p. 720-5.
44. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2007. **33 Suppl 1**: p. S1-75.
45. Bradbury, A.W., et al., *Multicentre randomised controlled trial of the clinical and cost-effectiveness of a bypass-surgery-first versus a balloon-angioplasty-first revascularisation strategy for severe limb ischaemia due to infrainguinal disease. The Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial*. *Health Technol Assess*, 2010. **14**(14): p. 1-210, iii-iv.
46. Lipsky, B.A., et al., *Diagnosis and treatment of diabetic foot infections*. *Clin Infect Dis*, 2004. **39**(7): p. 885-910.
47. Schaper, N.C., *Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: a progress report on criteria for including patients in research studies*. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2004. **20 Suppl 1**: p. S90-5.
48. Pittet, D., et al., *Outcome of diabetic foot infections treated conservatively: a retrospective cohort study with long-term follow-up*. *Arch Intern Med*, 1999. **159**(8): p. 851-6.
49. Ince, P., et al., *The association between baseline characteristics and the outcome of foot lesions in a UK population with diabetes*. *Diabet Med*, 2007. **24**(9): p. 977-81.
50. Peters, E.J., D.G. Armstrong, and L.A. Lavery, *Risk factors for recurrent diabetic foot ulcers: site matters*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(8): p. 2077-9.
51. Apelqvist, J., J. Larsson, and C.D. Agardh, *Long-term prognosis for diabetic patients with foot ulcers*. *J Intern Med*, 1993. **233**(6): p. 485-91.
52. Jude, E.B. and P.F. Unsworth, *Optimal treatment of infected diabetic foot ulcers*. *Drugs Aging*, 2004. **21**(13): p. 833-50.
53. Rao, N., B.H. Ziran, and B.A. Lipsky, *Treating osteomyelitis: antibiotics and surgery*. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127 Suppl 1**: p. 177S-187S.

54. Jirkovská, *Charcotova osteoartropatie*, in *Syndrom diabetické nohy*, A. Jirkovská, Editor. 2006, Maxdorf: Praha. p. 225-249.
55. Rajbhandari, S.M., et al., *Charcot neuroarthropathy in diabetes mellitus*. Diabetologia, 2002. **45**(8): p. 1085-96.
56. Rogers, L.C., et al., *The charcot foot in diabetes*. Diabetes Care, 2011. **34**(9): p. 2123-9.
57. Jeffcoate, W.J., F. Game, and P.R. Cavanagh, *The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes*. Lancet, 2005. **366**(9502): p. 2058-61.
58. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Archives of biochemistry and biophysics, 2008. **473**(2): p. 139-46.
59. Uccioli, L., et al., *Proinflammatory modulation of the surface and cytokine phenotype of monocytes in patients with acute Charcot foot*. Diabetes Care, 2010. **33**(2): p. 350-5.
60. Mabilieu, G., et al., *Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand*. Diabetologia, 2008. **51**(6): p. 1035-40.
61. Armstrong, D.G., et al., *The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association, 1997. **14**(5): p. 357-63.
62. Cavanagh, P.R., et al., *Radiographic abnormalities in the feet of patients with diabetic neuropathy*. Diabetes Care, 1994. **17**(3): p. 201-9.
63. Lukas, D., A. Sarkar, and P. Pokorny, *Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach*. J. Appl. Physics, 2008. **103**: p. 084309.
64. Darby, I.A. and T.D. Hewitson, *Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. Int Rev Cytol, 2007. **257**: p. 143-79.
65. Zhong, S.P., Y.Z. Zhang, and C.T. Lim, *Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.
66. Armstrong, D.G., L.A. Lavery, and L.B. Harkless, *Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation*. Diabetes Care, 1998. **21**(5): p. 855-9.
67. Veves, A., et al., *Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial*. Diabetes Care, 2001. **24**(2): p. 290-5.
68. Gentzkow, G.D., et al., *Use of dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers*. Diabetes Care, 1996. **19**(4): p. 350-4.
69. Winters, C.L., et al., *A multicenter study involving the use of a human acellular dermal regenerative tissue matrix for the treatment of diabetic lower extremity wounds*. Adv Skin Wound Care, 2008. **21**(8): p. 375-81.
70. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery, 2007. **33 Suppl 1**: p. S1-75.
71. Matoba, S., et al., *Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia*. Am Heart J, 2008. **156**(5): p. 1010-8.
72. Walter, D.H., et al., *Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA)*. Circulation. Cardiovascular interventions, 2011. **4**(1): p. 26-37.
73. De Vriese, A.S., et al., *Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans*. J Intern Med, 2008. **263**(4): p. 395-403.
74. Huang, P.P., et al., *Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans*. Thromb Haemost, 2007. **98**(6): p. 1335-42.
75. Powell, R.J., et al., *Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia*. Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter, 2011.
76. Canizo, M.C., et al., *Peripheral endothelial progenitor cells (CD133 +) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up*. Cytotherapy, 2007. **9**(1): p. 99-102.
77. Kudo, F.A., et al., *Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia*. International angiology : a journal of the International Union of Angiology, 2003. **22**(4): p. 344-8.

78. Schuch, G., et al., *Endostatin inhibits the vascular endothelial growth factor-induced mobilization of endothelial progenitor cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(23): p. 8345-50.
79. Urbich, C., et al., *Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin*. *FASEB J*, 2002. **16**(7): p. 706-8.
80. Kajiguchi, M., et al., *Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia*. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 2007. **71**(2): p. 196-201.
81. Gropler, R.J., et al., *Imaging myocardial metabolic remodeling*. *J Nucl Med*. **51 Suppl 1**: p. 88S-101S.
82. Sayman, H.B. and I. Urgancioglu, *Muscle perfusion with technetium-MIBI in lower extremity peripheral arterial diseases*. *J Nucl Med*, 1991. **32**(9): p. 1700-3.
83. Graziani, L., et al., *Vascular involvement in diabetic subjects with ischemic foot ulcer: a new morphologic categorization of disease severity*. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 2007. **33**(4): p. 453-60.
84. Karetova, D., et al., *The Czech ABI Project - prevalence of peripheral arterial disease in patients at risk using the ankle-brachial index in general practice (a cross-sectional study)*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2012. **33 Suppl 2**: p. 32-7.
85. Young, M.J., et al., *Improved survival of diabetic foot ulcer patients 1995-2008: possible impact of aggressive cardiovascular risk management*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(11): p. 2143-7.
86. Peikes, D., et al., *Effects of care coordination on hospitalization, quality of care, and health care expenditures among Medicare beneficiaries: 15 randomized trials*. *JAMA*, 2009. **301**(6): p. 603-18.
87. Apelqvist, J., et al., *Long-term costs for foot ulcers in diabetic patients in a multidisciplinary setting*. *Foot Ankle Int*, 1995. **16**(7): p. 388-94.
88. Ghanassia, E., et al., *Long-term outcome and disability of diabetic patients hospitalized for diabetic foot ulcers: a 6.5-year follow-up study*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(7): p. 1288-92.
89. Boulton, A.J., et al., *Dynamic foot pressure and other studies as diagnostic and management aids in diabetic neuropathy*. *Diabetes Care*, 1983. **6**(1): p. 26-33.
90. Jeffcoate, W.J. and K.G. Harding, *Diabetic foot ulcers*. *Lancet*, 2003. **361**(9368): p. 1545-51.
91. Lipsky, B.A., *A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot*. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2004. **20 Suppl 1**: p. S68-77.
92. Kowalski, T.J., et al., *The effect of residual osteomyelitis at the resection margin in patients with surgically treated diabetic foot infection*. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*, 2011. **50**(2): p. 171-5.
93. Lipsky, B.A., et al., *Clinical predictors of treatment failure for diabetic foot infections: data from a prospective trial*. *Int Wound J*, 2007. **4**(1): p. 30-8.
94. Mantey, I., et al., *Why do foot ulcers recur in diabetic patients?* *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 1999. **16**(3): p. 245-9.
95. Connor, H. and O.Z. Mahdi, *Repetitive ulceration in neuropathic patients*. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2004. **20 Suppl 1**: p. S23-8.
96. Armstrong, D.G. and L.A. Lavery, *Monitoring healing of acute Charcot's arthropathy with infrared dermal thermometry*. *J Rehabil Res Dev*, 1997. **34**(3): p. 317-21.
97. Lavery, L.A., et al., *Home monitoring of foot skin temperatures to prevent ulceration*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(11): p. 2642-7.
98. Fabrin, J., K. Larsen, and P.E. Holstein, *Long-term follow-up in diabetic Charcot feet with spontaneous onset*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(6): p. 796-800.
99. McGill, M., et al., *Response of Charcot's arthropathy to contact casting: assessment by quantitative techniques*. *Diabetologia*, 2000. **43**(4): p. 481-4.

Přehled vlastních publikací

Publikace týkající se tématu dizertační práce

Články publikované v časopisech s IF

1. Dubský M, Kubinová S, Sirc J, Voska L, Zajíček R, Zajícová A, Lesný P, Jirkovská A, Michálek J, Munzarová M, Holán V, Syková E. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. J Mater Sci: Mater Med 2012;(4):931-41 **IF 2012 = 2,141**
2. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarová V, Skibová J, Schaper NC, Lipsky BA. Risk factors for recurrence of diabetic foot ulcers: prospective follow-up analysis of a Eurodiale subgroup. Int Wound J. 2012 Jun 19. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01022.x. [Epub ahead of print] **IF 2012 = 1,600**
3. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Pagacova L, Sixta B, Varga M, Langkramer S, Sykova E, Jude EB. Both autologous bone marrow mononuclear cells peripheral blood progenitor cells therapies similarly improve ischemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. Diabetes Metab Res Rev. 2013;29(5):369-376 **IF 2012 = 2,968**
4. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Varga M, Kolesar L, Pagacova L, Sykova E, Jude EB. Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia. Cell Transplantation 2013.
Článek v recenzním řízení – 1. revize – IF 2012 = 4,420

Spoluautor:

1. Bem R, Jirkovska A, Dubsky M, Fejfarova V, Buncova M, Skibova J, Jude EB. Role of quantitative bone scanning in the assessment of bone turnover in patients with Charcot foot. Diabetes Care 2010; 33:348-9 **IF 2010 = 7,141**

Články publikované v časopisech bez IF

1. Dubský M, Jirkovska A, Bém R, Pagáčová L, Peregrin J, Kožnar B, Sixta B, Varga M, Langkramer Š, Lesný P, Syková E: Perspektivy terapie kmenovými buňkami u syndromu diabetické nohy. Bulletin HPB 2008; 16(4):80-2
2. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Lesný P, Syková E. Možnosti buněčné terapie ischemické choroby dolních končetin u syndromu diabetické nohy. DMEV. 2009;12(3):128-132
3. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Sixta B, Fejfarová V, Řezaninová L, Matoušková E, Skibová J. Acellulární porcinní dermis v lokální léčbě syndromu diabetické nohy. Prakt Lek 2010;90(6):342-8

4. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Varga M, Skibová J, Langkramer Š, Syková E. Terapie kritické končetinové ischemie u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí autologních kmenových buněk. *Vnitřní lékařství* 2011;57(5):451-455
5. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarová V. Stem cells in the treatment of diabetic foot. *Proceedings of 25th World Congress of the International Union of Angiology* 2012;(1):98-99

Spoluautor:

1. Zajíček R, Brož, L., Klein, L., Bláha, J., Koenigová, R., Jirkovská, A., Dubský, M., Bureš, I., Matoušková, E.: Xe-Derma: nový biologický kryt pro léčbu akutních a chronických ran. *Hojení ran* 2008;2:18-27.

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J: Comparison of healing capacity between acellular porcine dermis and porcine xenografts in diabetic foot disease. (Abstract). *EWMA Journal* 2009; 9(SMay):63
19th Conference of European Wound Management Association, Helsinki, Finsko, 20.-22. 5. 2009
2. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Main predictors for recurrence of diabetic foot ulcers: infection-related factors and diabetes control. (Abstract). *DFSG Abstract book*. 2009;8(1):20
8th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bled, Slovinsko, 25.-28. 9. 2009
3. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Buncová M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. A pilot study of the use of perfusion scintigraphy in the assesment of the lower limb perfusion after stem cell therapy in patients with diabetic foot disease. (Abstract). *DFSG Abstract book* 2010;9(1):29
9th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Uppsala, Švédsko, 17.-19. 9. 2010
4. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagáčová L, Fejfarová V, Skibová J, Varga M, Syková E. Comparison of healing of ischaemic diabetic foot ulcers after stem cell therapy or percutaneous transluminal angioplasty. (Abstract). *Diabetologia* 2010;53(Suppl1):S57
46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Stockholm, Švédsko, 19.-23. 9. 2010
5. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagacova L, Varga M, Fejfarova V, Skibová J, Sykova E. Comparison of Transcutaneous Oxygen Tension after Autologous Stem Cell Therapy and Percutaneous Transluminal Angioplasty in Patients with Diabetic Foot Disease (Abstract). *Diabetes* 2011;60(Suppl1):A18
71st Scientific Sessions American Diabetes Association, San Diego, USA, 24.-28. 6. 2011
Cena Marvin Levin Travel Scholarship za nejlepší přednášku a abstrakt v sekci Foot Care.
6. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagacova L, Fejfarova V, Varga M, Langkramer S, Sykova E. Comparison of Systemic Vasculogenesis and Clinical Effect of Two Different Methods of Stem Cell Therapy in Diabetic Foot (Abstract). *RMSC Abstract Book* 2011;4(1):260
BIT's 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2011, Peking, Čína, 11.-13. 11. 2011

7. Dubský M, Jirkovská A, Pagacova L, Bem R, Fejfarova V, Woskova V, Sixta B, Langkramer S, Sykova E. Assessment of local vasculogenesis and risk of systemic vasculogenesis after stem cell therapy in patients with diabetic foot disease (Abstract). IDF Abstract Book 2011. 21(1):130
21st International Diabetes Federation Congress, Dubaj, Spojené arabské emiráty, 4.-8. 12. 2011
8. Dubský M, Jirkovská A, Kubinová S, Sirc J, Voska L, Fejfarova V, Bem R, Michálek J, Holán V, Syková E. Comparison of nanofibers scaffolds and acellular porcine dermis in wound healing – experimental study (Abstract). DFSG Abstract Book 2012; 10(1):21
10th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Potsdam, Německo, 28. - 30. 9. 2012
9. Dubský M, Jirkovska A, Pagacova L, Bem R, Fejfarova V, Sixta B, Woskova V, Skibova J, Langkramer S, Sykova E. Relation between angiogenic cytokines and clinical effect of stem cell therapy in diabetic patients with no-option critical limb ischaemia (Abstract). Diabetologia 2012;55(Suppl1):S113
48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Berlín, Německo, 1. - 5. 10. 2012

Spoluautor:

1. Bem R, Jirkovská A, Fejfarová V, Buncová M, Skibová J, Dubský M. New quantitative bone scan parameters for the assessment of bone turnover activity in patients with Charcot foot. (Abstract). DFSG Abstract book. 2009;8(1):29
8th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bled, Slovinsko, 25.-28. 9. 2009
2. Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Pagáčová L, Sixta B, Varga M, Kožnar B, Syková E, Langkramer S.. First experience with different methods of stem cell therapy in patients with ischemic diabetic foot. (Abstract). DFSG Abstract book. 2009;8(1):3
28th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bled, Slovinsko, 25. - 28. 9. 2009
3. Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Pagáčová L, Sixta B, Peregrin J, Syková E. Our experience with stem cell therapy and PTA in patients with ischemic diabetic foot (Abstract). Bulletin of All Russian Scientific Conference 2012;77(S1):50-51
All Russian Scientific Conference with International Participation (Innovative Technology in Diabetology and Haematology), Petrohrad, Rusko, 24. - 26. 5. 2012
4. Varga M, Sixta B, Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Langkramer S, Adamec M.. Ischemická choroba dolných končatín a jej terapie kmeňovými bunkami u syndrómu diabetickej nohy. (Abstract). Vaskulárna medicína 2010;2(S1)
XIV. slovenský kongres cievnej chirurgie, Jasna, Slovensko, 25. - 28. 3. 2010

Postery s publikovanými abstraktami v zahraničí

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Skibová J, Sixta B, Rezaninová L.: Assesment of Acellular Porcine Dermis as a New Local Treatment of Diabetic Foot Ulcers (Abstract). DFSG Abstract Book 2008; 7(1):86
7th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Lucca, Itálie, 11. - 13. 9. 2008
2. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Varga M, Skibová J, Langkramer S, Lesný P, Syková E. Comparison of two different methods of stem cell

therapy of critical limb ischemia in patients with diabetic foot disease. (Abstract). Diabetes 2010;59(Suppl. 1):A323-324

70th Scientific Sessions American Diabetes Association, Orlando, USA, 25. - 29. 6. 2010

3. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Fejfarová V, Langkramer S, Syková E. Number of angiogenic precursor cells (CD34+) in relation with serum levels of angiogenic cytokines and transcutaneous oxygen tension in diabetic patients with critical limb ischemia after autologous stem cell therapy (Abstract). SCC Abstract Book 2012;4(1):166
4th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation: Quantitative Stem Cell Biology - From Models to Applications, Drážďany, Německo, 18. - 20. 7. 2012

Spoluautor:

1. Kubinová, Š., Dubský, M., Svobodová, J., Munzarová, M., Syková, E. Cell Seeded Electrospun Nanofibers As Scaffolds For Wound Healing (Abstract). Tissue Eng Reg Med, 2009; 6(12):247.
2nd TERMIS World Congress in conjunction with the 2009 Seoul Stem Cell Symposium, Seoul, Jižní Korea, 31. 8. – 3. 9. 2009

Přednášky s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Skibová J, Wosková V, Řezaninová L: Nahradí acelulární porcinní dermis (Xe-Derma) léčbu xenotransplantáty u syndromu diabetické nohy? (Abstract). Hojení ran 2009; 3(1):33
VII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 29. - 30. 1. 2009
2. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pagáčová L, Fexová P, Varga M, Syková E. Buněčná terapie syndromu diabetické nohy. (Abstract). Hojení ran 2010;4(1):65-66
VIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 28. - 29. 1. 2010
3. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Hlavní rizikové faktory recidivy syndromu diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2010;13(Suppl 1):21
XLVI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 22. - 24. 4. 2010
4. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Fejfarová V, Varga M, Vašíčková P, Kučerová M, Syková E. Porovnání dlouhodobého efektu léčby kmenovými buňkami a PTA u pacientů s těžkou ischemií dolních končetin a diabetem. (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2010;8(Suppl 2):S12-13
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2010
5. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Varga M, Sixta B, Fejfarová V, Vašíčková P, Langkramer S, Syková E. Porovnání efektu léčby kmenovými buňkami a perkutánní transluminální angioplastikou u pacientů s těžkou ischemií u syndromu diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2011;14(Suppl 1): 25-6
XLVII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2011
6. Dubský M, Jirkovská A, Kubinová Š, Širc J, Voska L, Bém R, Fejfarová V, Michálek J, Holáň V, Syková E. Nanotechnologie v lokální terapii hojení ran (Abstract). Hojení ran 2012;6(1):13-14

X. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2012

7. Dubský M, Jirkovská A, Kubinová Š, Širc J, Voska L, Fejfarová V, Bém R, Michálek J, Holáň V, Syková E. Porovnání nanovláken a acellulární porcinní dermis u hojení ran – experimentální studie (Abstract). DMEV 2012;15(Suppl 1):24
XLVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 19. - 21. 4. 2012
8. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pagáčová L, Sixta B, Varga M, Syková E. Příčiny selhání terapie kmenovými buňkami u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Hojení ran 2013;7(1):28
XI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2013
9. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Sixta B, Fejfarová V, Marek M, Syková E. Vztah mezi angiogenními cytokiny a klinickým efektem buněčné léčby u diabetiků s kritickou končetinovou ischemií (Abstract). DMEV 2013;16(Suppl 1):30-31
IL. Diabetologické dny v Luhačovicích, 18. - 20. 4. 2013

Spoluautor:

1. Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Pagáčová L, Sixta B, Varga M, Kožnar B, Peregrin J, Syková E, Langkramer Š: Terapie ischemie dolních končetin kmenovými buňkami u pacientů se syndromem diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2009; 12(S1):22-24
XLV. Diabetologické dny v Luhačovicích 23. - 25. 4. 2009
2. Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Pagáčová L, Sixta B, Varga M, Kožnar B, Syková E, Langkramer Š. Treatment of ischemic leg by stem cells. (Abstract). Advances in Cell and Gene Therapy: from basic research to clinical application 2010;1(1):22
1st International Conference on Advances in Cell, Gene Therapy and Immunotherapy, Mikulov, 23. - 25. 9.2010

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pagáčová L, Langkramer Š, Varga M, Syková E: Vliv terapie kmenovými buňkami na hojení syndromu diabetické nohy a posouzení vedlejších účinků. (Abstract). DMEV 2009; 12(S1):51
XLV. Diabetologické dny v Luhačovicích 23. - 25. 4. 2009
2. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Fejfarová V, Sixta B, Langkramer Š, Syková E: Ovlivní pokročilý angiografický nálezný efekt léčby kmenovými buňkami u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a syndromem diabetické nohy? (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2011; 9(S2):33-35
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 25. 11. 2011
3. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pagáčová L, Sixta B, Skibová J, Langkramer Š, Syková E. Hodnocení vedlejších účinků při léčbě kmenovými buňkami u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2012;10(Suppl 2):S28
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 23. 11. 2012

8.1 Publikace, které přímo nesouvisejí s tématem dizertační práce

Články publikované v časopisech bez IF

1. Dubský M, Jirkovská A, Wohl P, Bém R. Vliv nutričních a sociálních faktorů a compliance pacienta na hojení syndromu diabetické nohy. *Kasuistiky v diabetologii* 2009; 7:7-9
2. Dubský M, Jirkovská A. Moderní pohled na syndrom diabetické nohy. *Postgraduální medicína* 2012;14(5):547-552

Spoluautor:

1. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Wosková V, Fejfarová V. Charcot neuropathic osteoarthropathy and peripheral arterial disease. *Proceedings of 25th World Congress of the International Union of Angiology* 2012;(1):89-90
2. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Fexová P: Dlouhodobé zkušenosti s transkutánní oxymetrií. *Bulletin HPB* 2008; 16(4):75-9
3. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M: Péče o pacienty se syndromem diabetické nohy v ČR. *Lékařské Listy* 2009; 58(4):28-30
4. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Křížová M. Léčba syndromu diabetické nohy se zaměřením na metody odlehčení. *Hojení ran* 2009; 3:12-16
5. Fejfarová V., Jirkovská, A., Bém, R., Dubský, M., Wosková, W., Řezaninová, L., Křížová M. Screening a terapie syndromu diabetické nohy. *Sestra* 2010;20(12):57-58
6. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Sixta B, Wosková V. Amputace u diabetiků - existují možnosti zlepšení prognózy? *Angiologie* 2009, in: *Pokroky v angiologii*. Edited by Ambrózy, s. 70-75
7. Křížová M, Jirkovská A, Dubský M. Vybrané nové metody léčby diabetické nohy. *Florence* 2011;7(11):6-9

Spoluautor monografie

1. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Foster A, Křížová M, Lacigová S, Piřhová P, Wosková V, Záhumenský E. Studijní texty k certifikovanému kurzu pro všeobecné sestry v podiatrii. Podiatrická sekce České diabetologické společnosti ČLS JEP. Praha, 2009
2. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Jančařík V, Komorousová J, Křížová M, Lacigová S, Piřhová P, Sixta B, Wosková V, Záhumenský E.: *Praktická podiatrie. Základy péče o pacienty se syndromem diabetické nohy*. Praha, Maxdorf, 2011, ISSN-ISBN 978-80-7345-245-2

Elektronické publikace

1. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Řezaninová L, Wosková V: *Podiatrická péče o diabetiky v praxi*. Prague, Academia Medica Pragensis, 2009 (DVD)

2. Dubský M: Druhy inzulinů a základy léčby inzulinem, in Edukace diabetiků pro sestry. Edited by Jirkovská A. Prague, Pears Health Cyber, 2010 (webový výukový program)
Cena za nejlepší internetovou lekci EUNIO za rok 2010.

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Sixta B, Wosková V, Fejfarová V, Řezaninová L: Use of allogenic dermoepidermal grafts can accelerate healing of diabetic foot disease. (Abstract). EWMA Journal 2008; 8(S2):59
18th Conference of European Wound Management Association, Lisabon, Portugalsko, 14.-16. 5. 2008

Spoluautor:

1. Bém R, Jirkovská A, Novotný K, Fejfarová V, Dubský M, Řezaninová L, Fexová P: Maggot debridement therapy in patients with diabetic foot. (Abstract). EWMA Journal 2008; 8(S2):27
18th Conference of European Wound Management Association, Lisabon, Portugalsko, 14.-16. 5. 2008
2. Bém R, Jirkovská A, Novotný K, Fejfarová V, Dubský M, Řezaninová L, Fexová P: Effect of maggot debridement therapy on diabetic foot infection. (Abstract). DFSG abstract book 2008; 7(1):63
7th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Lucca, Itálie, 11.-13. 9. 2008
3. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Kožnarová R, Saudek F, Adamec M, Skibová J. Charcot neuroosteoarthropathy in diabetic patients after transplantation is associated with diabetic retinopathy. (Abstract). IDF Abstract Book 2009; 1:22-23
20th International Diabetes Federation Congress, Montreal, Kanada, 18.-22. 10. 2009
4. Bem R, Jirkovská A, Čerovský V, Fejfarová V, Žďárek J, Dubský M, Monincova L. Analysis of antimicrobial peptides from maggots potentially effective in the treatment of infected diabetic foot. (Abstract). DFSG Abstract book 2010;9(1):42
9th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Uppsala, Švédsko, 17.-19. 9. 2010
Cena za nejlepší přednášku kongresu.
5. Bem R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Skibová J, Čerovský V. Acute antimicrobial effect of maggot therapy on diabetic foot ulcer infection as a basis for identification of antimicrobial peptides from maggots. (Abstract). Diabetologia 2010;53(Suppl1):S56
46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Stockholm, Švédsko, 19.-23. 9. 2010
6. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Wosková V, Fejfarová V, Skibová J. Peripheral arterial disease is not rare in diabetic patients with ulcerated charcot foot. (Abstract). The Diabetic Foot Abstract Book 2011;6(1):104
6th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 10. - 14. 5. 2011
7. Bem R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Čerovský V. Long-term experience with maggots and negative pressure wound therapy in patients with diabetic foot (Abstract). Bulletin of All Russian Scientific Conference 2012;77(S1):49
All Russian Scientific Conference with International Participation (Innovative Technology in Diabetology and Haematology), Petrohrad, Rusko, 24. – 26. 5. 2012

8. Bem R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Wosková V, Skibová J. Ozone and maggot therapy acutely eliminate bacteria strains in patients with infected diabetic foot ulcers (Abstract). DFSG Abstract Book 2012; 10(1):32
10th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Potsdam, Německo, 28. - 30. 9. 2012
9. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Rezaninová L, Skibová J. Does negative wound pressure therapy have a similar acute antimicrobial effect as maggot and ozone therapy on diabetic foot ulcer infection? (Abstract). Diabetologia 2012;55(Suppl1):S113
48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Berlín, Německo, 1. - 5. 10. 2012
10. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Křížová M, Petkov V, Skibová J: The effect of different factors, especially MRSA, on important clinical endpoints in patients with the diabetic foot. (Abstract). EWMA Journal 2009; 9(SMay):61
19th Conference of European Wound Management Association, Helsinki, Finsko, 20. - 22. 5. 2009
11. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Skibová J. The course of long-term off-loading therapy by TCC and RCW in patients with more severe diabetic foot ulcers. (Abstract). DFSG Abstract book. 2009;8(1):46
8th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bled, Slovinsko, 25. -28. 9. 2009
Cena za nejlepší přednášku kongresu.
12. Fejfarová V, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Wosková V, Skibová J. Usage of different local therapeutics in patients with MRSA and non-MRSA infected diabetic foot ulcers. (Abstract). EWMA Journal 2010;10(2):85
20th Conference of European Wound Management Association, Ženeva, Švýcarsko, 26. - 28. 5. 2010
13. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecká E, Bem R, Dubský M, Wosková V, Krizová M, Skibová J. The differences in selected psychological characteristics between diabetic patients with and without the diabetic foot. (Abstract). EWMA Journal 2011; 11(2):91
21st Conference of European Wound Management Association, Brusel, Belgie, 25. - 27. 5. 2011
14. Fejfarová V, Jirkovská A, Dubský M, Kucerová M, Vydláková J, Sekerková A, Franeková J, Bem R, Wosková V, Skibová J. Have patients with diabetic foot ulcers infected by resistant pathogens deteriorated immune functions? (Abstract). EWMA Journal 2012; 12(2):91
22nd Conference of European Wound Management Association, Vídeň, Rakousko, 23. - 25. 5. 2012
15. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecká E, Bem R, Dubský M, Wosková V, Roztocil K, Krizová M, Skibová J. Does the peripheral arterial disease influence certain psychological parameters in patients with the diabetic foot (Abstract). International Angiology 2012; 31(S1):56-57
25th World Congress of International Union of Angiology, Prague, Czech Republic, 1. - 5. 7. 2012
16. Fejfarová V, Jirkovská A, Dubský M, Kučerová M, Vydláková J, Sekerková A, Franeková J, Hunal Z, Bém R, Wosková V, Skibová J. Immune Functions in Patients with Diabetic Foot Ulcers Infected especially by Resistant Microorganisms (Abstract). DFSG Abstract Book 2012; 10(1):33

10th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Potsdam, Německo, 28. - 30. 9. 2012

17. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Sixta B, Hačkář D, Řezaninová L, Fejfarová V: Follow-up of amputation rate and related factors in diabetic foot center. (Abstract). EWMA Journal 2008; 8(S2):24
18th Conference of European Wound Management Association, Lisabon, Portugalsko, 14. - 16. 5. 2008
18. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J.: The difference in bone density between Type 1 and non-obese Type 2 diabetic patients with Charcot neuro-osteoarthropathy (Abstract). DFSG Abstract Book 2008; 7(1):3
47th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Lucca, Itálie, 11. -13. 9. 2008

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Dubský M, Jirkovská A, Pagacová L, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Inherited prothrombic disorders in patient with diabetic foot and unsuccessful percutaneous transluminal angioplasty. (Abstract). The Diabetic Foot Abstract Book 2011;6(1):149
6th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 10. - 14. 5. 2011

Spoluautor:

1. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Lupínková J, Skibová J: Reproducibility of power spectral analysis of heart rate variability in acute and chronic phase of Charcot's neuroarthropathy. (Abstract). Diabetologia 2008; 51(S1):S500-501
44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Řím, Itálie, 7. -11. 9. 2008
2. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Kožnarová R, Saudek F, Adamec M. Charcot neuroosteoarthropathy in patients with pancreas-kidney transplantation and pancreas transplant alone. (Abstract). Diabetologia. 2009;52(Suppl. 1):S447-448
45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Vídeň, Rakousko, 29. 9. - 2. 10. 2009
3. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Kožnarová R, Skibová J, Adamec M, Bouček P, Saudek F. 5-year incidence of and risk factors for Charcot neuroosteoarthropathy after pancreas transplantation. (Abstract). Diabetes 2010;59(Suppl. 1):A323
70th Scientific Sessions American Diabetes Association, Orlando, USA, 25. - 29. 6. 2010
4. Bem R, Jirkovska A, Dubsky M, Woskova V, Jirkovska A, Fejfarova V, Skibova J. Role of Lower Limb Angiography in Patients with Charcot Neuroosteoarthropathy and Non-healing Foot Ulcers (Abstract). Diabetes 2011;60(Suppl. 1):A194
71st Scientific Sessions American Diabetes Association, San Diego, USA, 24. - 28. 6. 2011
5. Fejfarová V, Hanzlíková D, Franců M, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Skibová J. Leg ulcers - is there any argument for podiatric wound care? (Abstract). DFSG Abstract book 2010;9(1):84
9th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Uppsala, Švédsko, 17. - 19. 9. 2010

6. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecka E, Bem R, Dubský M, Wosková V, Lánská V. Does the type of off-loading have any impact on the quality of life in patients treated for the diabetic foot? (Abstract). *Diabetologia* 2010;53(Suppl1):S458
46th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Stockholm, Švédsko, 19. - 23. 9. 2010
7. Fejfarová V, Jirkovská A, Girman P, Petkov V, Dubsky M, Bem R, Saudek F, Skibova J. The trend of microbial antibiotic resistance in transplant patients with the diabetic foot after 11 years (Abstract). *The Review of Diabetic Studies* 2011;8(1):178-179
13th World Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association, Praha, ČR, 1. – 4. 6. 2011
8. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecká E, Bem R, Dubsky M, Woskova V, Lanska V. Are certain psychological parameters independent risk factors for outcomes of diabetes therapy? (Abstract). *Diabetologia* 2011;54(Suppl1):S469
47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Lisabon, Portugalsko, 12. - 16. 9. 2011
9. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecká E, Dubsky M, Bem R, Woskova V, Krizova M, Skibova J. Social characteristics are more deteriorated than psychological profiles in patients with diabetic foot (Abstract). *IDF Abstract Book* 2011. 21(1):308
21st International Diabetes Federation Congress, Dubaj, Spojené arabské emiráty, 4. – 8. 12. 2011
10. Fejfarova V, Jirkovska A, Vasickova P, Rezaninova L, Dubsky M, Bem R, Woskova V, Kucerova M. First experience with topical wound oxygenation – does it contribute to healing of the diabetic foot (a pilot study)? (Abstract). *Diabetes Technology & Therapeutics* 2013. 15(S1):A118
The 6th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes, Paříž, Francie, 27. 2. – 2. 3. 2013
11. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Čechová K, Řezaninová L: The Neuropad: a simple test to evaluate of diabetic neuropathy and risk of diabetic foot ulcer. (Abstract) *EWMA Journal* 2008; 8(S2):161
18th Conference of European Wound Management Association, Lisabon, Portugalsko, 14. - 16. 5. 2008
Cena za nejlepší poster kongresu.
12. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M., Čechová K., Peregrin J, Koznar B: Is ankle-brachial pressure index sufficient test for indication of percutaneous transluminal angioplasty in patients with diabetic foot ulcers? (Abstract). *DFSG Abstract Book* 2008; 7(1):68
7th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Lucca, Itálie, 11. - 13. 9. 2008
13. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Čechova K. Is Neuropad test also effective for mild neuropathy detection? (Abstract). *DFSG Abstract book*. 2009;8(1):80
8th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bled, Slovinsko, 25. - 28. 9. 2009
14. Wosková V, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Čechova K, Peregrin J, Kožnar B. Effect of percutaneous transluminal angioplasty in patients with diabetic foot ulcer and ankle-brachial pressure index above 0.9. (Abstract). *IDF Abstract Book* 2009; 1:257
20th International Diabetes Federation Congress, Montreal, Kanada, 18. - 22. 10. 2009

15. Wosková V, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Křížová M, Skibová J. A comparison of Neuropad test with cardiovascular autonomic and distal neuropathy assessment in diabetic patients with Charcot foot. (Abstract). DFSG Abstract book 2010;9(1):76
9th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Uppsala, Švédsko, 17.-19.9. 2010
16. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Fexová P. Reliability of transcutaneous oxygen pressure measurements in patients with diabetic foot in clinical practice. (Abstract). The Diabetic Foot Abstract Book 2011;6(1):138
6th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 10. - 14. 5. 2011
17. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Vasicková P. Reliability of transcutaneous oxygen pressure and Doppler ankle brachial index measurements in patients with diabetic foot. (Abstract). IDF Abstract Book 2011. 21(1):417
21st International Diabetes Federation Congress, Dubaj, Spojené arabské emiráty, 4. – 8. 12. 2011
18. Woskova V, Jirkovska A, Bem R, Dubsky M, Fejfarova V, Skibova J. The comparison of non-invasive vascular tests with angiographic findings in patients with diabetic foot syndrome (Abstract). International Angiology 2012; 31(S1):193-194
25th World Congress of International Union of Angiology, Prague, Czech Republic, 1. - 5. 7. 2012
19. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Sixta B, Petkov V. Could be coagulase-negative Staphylococcus a causative pathogen of chronic osteomyelitis in patients with diabetic foot? (Abstract). DFSG Abstract Book 2012; 10(1):85
10th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Potsdam, Německo, 28. - 30. 9. 2012

Přednášky s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Bém R, Jirkovská A, Novotný K, Fejfarová V, Dubský M, Řezaninová L, Fexová P: Larvální terapie syndromu diabetické nohy. (Abstract). Hojení ran 2008; 2(1):18
VI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 25. - 26. 1. 2008
2. Bém R, Jirkovská A, Novotný K, Fejfarová V, Dubský M, Řezaninová L, Fexová P: Larvální terapie syndromu diabetické nohy a její vliv na eliminaci MRSA u diabetických ulcerací. (Abstract). DMEV 2008; 11(S1):19
XLIV. Diabetologické dny v Luhačovicích 16. - 19. 4. 2008
3. Bém R, Jirkovska A, Dubský M, Fejfarová V, Řezaninová L: Léčba lokálním podtlakem u syndromu diabetické nohy. (Abstract). Hojení ran 2009; 3(1):30-31
VII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 29. -30. 1. 2009
4. Bém R, Jirkovska A, Dubský M, Fejfarová V, Lupínková J, Skibová J: Reproducibilita spektrální analýzy variability srdeční frekvence v akutním a chronickém stádiu Charcotovy neuroosteoarthropatie a její asociace s aktivitou kostní remodelace. (Abstract). DMEV 2009; 12(S1):24-25
XLV. Diabetologické dny v Luhačovicích 23. - 25. 4. 2009

5. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Skibová J, Adamec M, Boucek P, Saudek F. 5-ti letá incidence a rizikové faktory Charcotovy neuroosteoarthropatie po kombinované transplantaci pankreatu a ledviny a izolované transplantaci pankreatu. (Abstract). DMEV 2010;13(Suppl 1):21
XLVI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 22. - 24. 4. 2010
6. Bém R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Skibová J, Fucik V, Čěrovský V. Antimikrobiální efekt larvální terapie a izolace účinných peptidů u syndromu diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2011;14(Suppl 1):26
XLVII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2011
7. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Wosková V, Fejfarová V, Skibová J. Častý výskyt ischemické choroby dolních končetin u pacientů s Charcotovou osteoartropatií a ulceracemi. (Abstract). DMEV 2012;15(Suppl 1): 28
XLVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 19. - 21. 4. 2012
8. Bém R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Wosková V. Antimikrobiální efekt podtlakové, ozónové a larvální terapie u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Hojení ran 2013;7(1):31
XI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2013
9. Bém R, Jirkovská A, Brunová J, Dubský M, Schubertová M, Wosková V, Fejfarová V, Kratochvílová S, Klečáková M. Význam kvantitativní ultrasonometrie patní kosti u pacientů s diabetem (Abstract). DMEV 2013;16(Suppl 1):30
II. Diabetologické dny v Luhačovicích, 18. - 20. 4. 2013
10. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Křížová M, Skibová J: Srovnání léčby snímatelnými, nesnímatelnými TCC a ortézami Walker, kazuistiky. (Abstract). Hojení ran 2009; 3(1):33-34
VII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 29. - 30. 1. 2009
11. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V. Screening a terapie syndromu diabetické nohy. Instrukční videoprogram - "Podiatrická péče v praxi". (Abstract). Hojení ran 2010;4(1):65
VIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 28. - 29. 1. 2010
12. Fejfarová V, Jirkovská A, Hanzlíková D, Franců M, Bém R, Dubský M, Wosková V, Skibová J. Bércové vředy a diabetes mellitus. (Abstract). Hojení ran 2010;4(1):68-69
VIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 28. - 29. 1. 2010
13. Fejfarová V, Jirkovská A, Kučerová M, Stříbrská A, Dubský M, Bém R, Wosková V. Možnosti lokálního krytí a lokální terapie u syndromu diabetické nohy. (Abstract). Hojení ran 2012;6(1):14
X. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2012
14. Fejfarová V, Jirkovská A, Dubský M, Vašíčková V, Řezaninová L, Bém R, Wosková V, Kučerová M. Lokální oxygenoterapie u syndromu diabetické nohy (Abstract). Hojení ran 2013;7(1):32

XI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2013

15. Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Hačkejlo D, Sixta B, Wosková V, Řezaninová L, Čechová K: Amputace a cévní intervence u pacientů se syndromem diabetické nohy v diabetologickém centru. (Abstract). DMEV 2008; 11(S1):19
XLIV. Diabetologické dny v Luhačovicích 16. - 19. 4. 2008
16. Jirkovská A, Fejfarová V, Bém R, Wosková V, Dubský M, Křížová M, Lacigová S, Piťhová P. Zkušenosti z prvního ročníku certifikovaného kurzu pro všeobecné sestry v podiatrii. (Abstract). Hojení ran 2010;4(1):64-65
VIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 28. - 29. 1. 2010
17. Jirkovská A, Dubský M. Aktuality v podiatrické péči. (Abstract). Hojení ran 2011;5(1):32
IX. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 27. - 28. 1. 2011
18. Jirkovská A, Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V. Jaká jsou rizika zvýšeného počtu amputací u diabetiků? (Abstract). Hojení ran 2013;7(1):26-27
XI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2013
19. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Čechová K, Řezaninová L: Diagnostika neuropatie a posouzení rizika diabetických ulcerací indikačním testem Neuropad. (Abstract). DMEV 2008; 11(S1):35-36
XLIV. Diabetologické dny v Luhačovicích 16. - 19. 4. 2008
20. Buncová, M., Dubský, M., Jirkovská, A., Ejekční frakce LK po aplikaci kmenových buněk pro syndrom diabetické nohy stanovená 99mTcMIBI scintigrafií (Abstract). Sborník abstrakt 2010. 47: p. 15.
XLVII. Dny nukleární medicíny, Havlíčkův Brod, 8. – 10. 9. 2010

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Sixta B, Fejfarová V, Řezaninová L: Použití allogenních dermoepidermálních krytí urychluje hojení ran u syndromu diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2008; 11(S1):56-58
XLIV. Diabetologické dny v Luhačovicích 16. - 19. 4. 2008

Spoluautor:

1. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Petkov V, Skibová J: Mají multirezistentní β -laktamáza pozitivní patogeny stejný vliv na hojení ulcerací jako rezistentní stafylokoky? (Abstract). DMEV 2009; 12(S1):53
XLV. Diabetologické dny v Luhačovicích 23. - 25. 4. 2009
2. Fejfarová V, Hanzlíková D, Franců M, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Skibová J. Je vhodné indikovat podiatrickou péči u nemocných s bérčovými vředy? (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2010;8(Suppl 2):S30-31
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 26. 11. 2010

3. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecka E, Bém R, Dubský M, Wosková V, Křížová M, Skibová J. Vliv odlehčovacích pomůcek na vybrané psychologické parametry u pacientů se syndromem diabetické nohy. (Abstract). DMEV 2011;14(Suppl 1): 37
XLVII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2011
4. Fejfarová V, Jirkovská A, Dubský M, Kučerová M, Vydláková J, Sekerková A, Franková J, Hunal Z, Bém R, Wosková V, Skibová J. Poruchy imunitního systému u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi (Abstract). DMEV 2012;15(Suppl 1):41
XLVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 19. - 21. 4. 2012
4. Fejfarová V, Jirkovská A, Vašíčková P, Řezaninová L, Bém R, Dubský M, Wosková V, Kučerová M. První zkušenosti s metodikou lokální oxygenoterapie – přispěje k hojení syndromu diabetické nohy? (pilotní studie). (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2012;10(Suppl 2):S34
Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 23. 11. 2012
5. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Sixta B, Petkov V. Koaguláza negativní stafylokok – kauzální příčina osteomyelitidy u pacientů se syndromem diabetické nohy? (Abstract). DMEV 2013;16(Suppl 1):43
II. Diabetologické dny v Luhačovicích, 18. - 20. 4. 2013
6. Folířová V, Petříková P, Dubský M, Těhotenství u pacientky s transplantovanou ledvinou a slinivkou - ano či ne? (Abstract). Sestra v diabetologii, 2010. 6(S1): p. 6-7.
XLVI. Diabetologické dny v Luhačovicích 23. - 25. 4. 2010
7. Forejtová L, Vamberská V, Dubský M, Opakované uroinfekce u pacientky po transplantaci ledviny a pankreatu (Abstract). Sestra v diabetologii, 2011. 7(S1): p. 6.
XLVII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2011
8. Niklová J, Fajnová M, Folířová V, Dubský M, Rejekce u cizince po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu (Abstract). Sestra v diabetologii, 2012. 8(S1): p. 6-7.
XLVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 19. - 21. 4. 2012

9 Přílohy dizertační práce

Příloha č. 1: Dubský M, Kubinová S, Sirc J, Voska L, Zajíček R, Zajícová A, Lesný P, Jirkovská A, Michálek J, Munzarová M, Holán V, Syková E. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. J Mater Sci: Mater Med 2012;(4):931-41 **IF 2012 = 2,141**

Příloha č. 2: Dubský M, Jirkovská A, Kubinová S, Sirc J, Voska L, Fejfarova V, Bem R, Michálek J, Holán V, Syková E. Comparison of nanofibers scaffolds and acellular porcine dermis in wound healing – experimental study (Abstract). DFSG Abstract Book 2012; 10(1):20

Příloha č. 3: Dubský M, Jirkovská A, Kubinová Š, Širc J, Voska L, Bém R, Fejfarová V, Michálek J, Holán V, Syková E. Nanotechnologie v lokální terapii hojení ran (Abstract). Hojení ran 2012;6(1):13-14

Příloha č. 4: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Sixta B, Fejfarová V, Řezaninová L, Matoušková E, Skibová J. Acellulární porcinní dermis v lokální léčbě syndromu diabetické nohy. Prakt Lek 2010;90(6):342-8

Příloha č. 5: Dubský M, Jirkovska A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J: Comparison of healing capacity between acellular porcine dermis and porcine xenografts in diabetic foot disease. (Abstract). EWMA Journal 2009; 9S(May):63

Příloha č. 6: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Skibová J, Sixta B, Rezaninová L.: Assesment of Acellular Porcine Dermis as a New Local Treatment of Diabetic Foot Ulcers (Abstract). DFSG Abstract Book 2008; 7(1):86

Příloha č. 7: Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Pagacova L, Sixta B, Varga M, Langkramer S, Sykova E, Jude EB. Both autologous bone marrow mononuclear cells peripheral blood progenitor cells therapies similarly improve ischemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. Diabetes Metab Res Rev. 2013 Feb. doi: 10.1002/dmrr.2399.[Epub ahead of print] **IF 2012 = 2,968**

Příloha č. 8: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagacova L, Fejfarova V, Varga M, Langkramer S, Sykova E. Comparison of Systemic Vasculogenesis and Clinical Effect of Two Different Methods of Stem Cell Therapy in Diabetic Foot (Abstract). RMSC Abstract Book 2011;4(1):260

Příloha č. 9: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Varga M, Skibová J, Langkramer S, Lesný P, Syková E. Comparison of two different methods of stem cell therapy of critical limb ischemia in patients with diabetic foot disease. (Abstract). Diabetes 2010;59(Suppl. 1):A323-324

Příloha č. 10: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarova V, Varga M, Kolesar L, Pagacova L, Sykova E, Jude EB. Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia. Cell Transplantation 2013

Článek v recenzním řízení – 1. revize – IF 2012 = 4,420

Příloha č. 11: Dubský M, Jirkovská A, Pagacova L, Bem R, Fejfarova V, Sixta B, Woskova V, Skibova J, Langkramer S, Sykova E. Relation between angiogenic cytokines and clinical effect of stem cell therapy in diabetic patients with no-option critical limb ischaemia (Abstract). *Diabetologia* 2012;55(Suppl1):S113

Příloha č. 12: Dubský M, Jirkovská A, Pagacova L, Bem R, Fejfarova V, Woskova V, Sixta B, Langkramer S, Sykova E. Assessment of local vasculogenesis and risk of systemic vasculogenesis after stem cell therapy in patients with diabetic foot disease (Abstract). *IDF Abstract Book* 2011. 21(1):130

Příloha č. 13: Dubský M, Jirkovská A, Pagacová L, Bém R, Fejfarová V, Langkramer S, Sykova E. Number of angiogenic precursor cells (CD34+) in relation with serum levels of angiogenic cytokines and transcutaneous oxygen tension in diabetic patients with critical limb ischemia after autologous stem cell therapy (Abstract). *SCC Abstract Book* 2012;4(1):166

Příloha č. 14: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Buncová M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. A pilot study of the use of perfusion scintigraphy in the assesment of the lower limb perfusion after stem cell therapy in patients with diabetic foot disease. (Abstract). *DFSG Abstract book* 2010;9(1):29

Příloha č. 15: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagacova L, Varga M, Fejfarova V, Skibová J, Sykova E. Comparison of Transcutaneous Oxygen Tension after Autologous Stem Cell Therapy and Percutaneous Transluminal Angioplasty in Patients with Diabetic Foot Disease (Abstract). *Diabetes* 2011;60(Suppl1):A18

Příloha č. 16: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Pagáčová L, Fejfarová V, Skibová J, Varga M, Syková E. Comparison of healing of ischaemic diabetic foot ulcers after stem cell therapy or percutaneous transluminal angioplasty. (Abstract). *Diabetologia* 2010;53(Suppl1):S57

Příloha č. 17: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Varga M, Skibová J, Langkramer Š, Syková E. Terapie kritické končetinové ischemie u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí autologních kmenových buněk. *Vnitřní lékařství* 2011;57(5):451-455

Příloha č. 18: Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Fejfarová V, Sixta B, Langkramer Š, Syková E. Ovlivní pokročilý angiografický nález efekt léčby kmenovými buňkami u pacientů s kritickou končetinovou ischemií a syndromem diabetické nohy? (Abstract). *Kazuistiky v diabetologii* 2011; 9(S2):33-35

Příloha č. 19: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarová V. Stem cells in the treatment of diabetic foot. *Proceedings of 25th World Congress of the International Union of Angiology* 2012;(1):98-99

Příloha č. 20: Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarová V, Skibová J, Schaper NC, Lipsky BA. Risk factors for recurrence of diabetic foot ulcers: prospective follow-up analysis of a Eurodiale subgroup. *Int Wound J.* 2012 Jun 19. doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01022.x. [Epub ahead of print] **IF 2012 = 1,600**

Příloha č. 21: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Main predictors for recurrence of diabetic foot ulcers: infection-related factors and diabetes control. (Abstract). *DFSG Abstract book.* 2009;8(1):20

Příloha č. 22: Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Hlavní rizikové faktory recidivy syndromu diabetické nohy. (Abstract). *DMEV* 2010;13(Suppl 1):21

Příloha č. 23: Bem R, Jirkovska A, Dubsky M, Fejfarova V, Buncova M, Skibova J, Jude EB. Role of quantitative bone scanning in the assessment of bone turnover in patients with Charcot foot. Diabetes Care 2010; 33:348-9 **IF 2010 = 7,141**